

**Über die Isolierung und Struktur von
Rheinglykosiden aus Rheum palmatum L.**

Klaus Meyer

1961

Über die Isolierung und Struktur von Rheinglykosiden aus

Rheum palmatum L.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität

zu München

vorgelegt

von

Klaus Meyer

aus

Oelde in Westfalen

März 1961



Berichterstatter: Professor Dr. L. H ö r h a m m e r

Tag der mündlichen Prüfung: 10.5.1961

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	1
ALLGEMEINER TEIL	3
A. Isolierung der Glykoside	3
1. Übersicht über Isolierungsmethoden für Anthrachinon- glykoside	3
2. Papierchromatographische Voruntersuchungen	5
3. Isolierung des Glykosids A	9
4. Versuche zur Gewinnung des Glykosids B	13
B. Strukturaufklärung der Glykoside	14
1. Identifizierung des Glykosids A	14
2. Untersuchung über die Struktur des Rheins	27
3. Stellung der Glucose im Rheinglykosid	37
4. Versuche zur Identifizierung des Glykosids B	40
C. Über Polymerprodukte des Rheins	42
1. Untersuchung eines aus Rhein erhaltenen Belichtungs- produktes	46
2. Diskussion einer Polymerisationsmöglichkeit	49
D. Pharmakologische Untersuchungen	51
1. Wahl einer Methode	52
2. Diskussion der Ergebnisse	52
EXPERIMENTELLER TEIL	54
A. Papierchromatographie	54
B. Isolierung des Glykosids A	55
1. Herstellung eines Rheum-Gesamtexttraktes	55
2. Chromatographie des Extraktes über Polyamid	55
3. Abtrennung der Gerbstoffe über Ionenaustauscher	56
4. Reinigung des Glykosids A über Polyamid	57
C. Identifizierung des Glykosids A	57
1. Papierchromatographische Untersuchungen	57
2. Schmelzpunkte	58
3. Mikroanalysen	59
4. UV-absorptionsspektrophotometrische Untersuchungen	59

	Seite
5. IR-spektrophotometrische Untersuchungen	60
6. Hydrolysen	60
7. Papierelektrophoretischer Nachweis des Zuckers . .	65
D. Untersuchungen über die Struktur des Rheins	66
1. Präparative Darstellungen des Rheins	66
2. Herstellung des Diazetylrheinmethylesters	67
3. Molekulargewichtsbestimmung des Diazetylrheinmethylesters	68
4. Mikroanalysen	68
5. "Spaltungsversuch" am Rhein mit Salzsäure im wässrigen Milieu	69
E. Isolierung und Identifizierung des Glykosids B	69
1. Präparative Papierchromatographie	69
2. Gewinnung mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie .	70
3. Hydrolyse des Glykosids B	70
4. Papierchromatographische Untersuchungen	71
5. UV-spektrophotometrische Untersuchungen	72
F. Über Polymerprodukte des Rheins	72
1. Untersuchung der Oxydationsprodukte des Sennidins .	72
2. Belichtung von Rhein in Pyridin	73
3. Erhitzen von Rhein in Pyridin unter Lichtabschluß .	73
4. Belichtungsversuch mit Rhein in Pyridin/Piperidin .	74
G. Pharmakologische Untersuchungen	74

E I N L E I T U N G

Im Jahre 1895 fand O. HESSE¹⁾ bei seinen Arbeiten im ätherischen Extrakt der Rhabarberwurzel neben Chrysophanol und Emodin ein bis dahin unbekanntes Anthrachinonderivat, dem er den Namen R h e i n gab. Mit der Aufstellung der Bruttoformel durch A. TSCHIRCH und K. HEUBERGER²⁾ war der erste Schritt zur Analyse des Rheins getan. In der Folgezeit war es vor allem O.A. OESTERLE³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾, der sich mit der Konstitutionsaufklärung beschäftigte. Er ermittelte als Substituenten zwei Hydroxyl- und eine Carboxylgruppe am Anthrachinongestüt und stellte fest, daß die Reduktion des Rheins Aloe-Emodin ergab, dessen Struktur schon bekannt war. Auf Grund dieser Kenntnisse schlug er für Rhein eine Konstitutionsformel vor, die 1922 von R. EDER und C. WIDMER⁹⁾ insofern bestätigt wurde, als diesen die Synthese der Chrysophansäure gelang, aus der O. FISCHER¹⁰⁾ durch Oxidation Rhein dargestellt hatte.

Eine erneute Bearbeitung der Konstitutionsformel des Rheins erfolgte kürzlich durch L. HÖRHAMMER, H. WAGNER und I. KÖHLER¹¹⁾¹²⁾¹³⁾, da sie festgestellt hatten, daß das Rhein durch Behandlung mit Salzsäure chemisch verändert wurde, was sie im Sinne der Spaltung eines Dianthrone deuteten. Auf Grund von Vergleichsuntersuchungen am Sennidin sowie dessen Glucosid, dem Sennosid, schlossen sie auf eine dem Sennidin analoge dimere Struktur des Rheins.

In der Droge liegen die Anthrachinone frei und in gebundener Form vor, wie zuerst von A. TSCHIRCH¹⁴⁾ nachgewiesen werden konnte.

- 1) O. HESSE, Pharmac.J., (4), 1, 326 (1895)
- 2) A. TSCHIRCH u. K. HEUBERGER, Arch. Pharmaz., 240, 596 (1902)
- 3) O.A. OESTERLE, Arch. Pharmaz., 241, 604 (1903)
- 4) O.A. OESTERLE u. E. TISZA, Arch. Pharmaz., 246, 434 (1908)
- 5) O.A. OESTERLE u. E. TISZA, Schweiz. Wschr. Chem. Pharmaz., 46, 702 (1908)
- 6) O.A. OESTERLE u. G. RIAT, Arch. Pharmaz., 247, 527 (1909)
- 7) O.A. OESTERLE, Arch. Pharmaz., 249, 445 (1911)
- 8) O.A. OESTERLE, Arch. Pharmaz., 250, 300 (1912)
- 9) R. EDER u. C. WIDMER, Helv. chim. Acta 5, 3 (1922)
- 10) O. FISCHER, F. FALCO u. H. GROSS, J. prakt. Chem., 83, 211 (1911)
- 11) H. WAGNER u. I. KÖHLER, Naturwissenschaften, 44, 260 (1957)
- 12) L. HÖRHAMMER, H. WAGNER u. I. KÖHLER, Naturwissenschaften, 45, 389 (1958)
- 13) L. HÖRHAMMER, H. WAGNER u. I. KÖHLER, Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges., 292/64, 591 (1959)
- 14) A. TSCHIRCH, Ber. dtsch. pharmaz. Ges., 1898, S. 176

Seine Bemühungen, das Rheinglykosid und andere Anthrachinonglykoside zu isolieren, führten zu dem amorphen Produkt "Rheoanthraglykosid"¹⁵⁾, das nach Hydrolyse eine Mischung von Anthrachinonderivaten ergab. Auch E. GILSON¹⁶⁾ und F. TUTIN und H.W.B. CLEWER¹⁷⁾ und in neuerer Zeit A.C. BELLAART¹⁸⁾ erhielten bei ihren Isolierungsversuchen aus dem Rhabarber nur kristalline Gemische von Anthrachinonglykosiden. Eine Reindarstellung nach den bisherigen Trennungsverfahren war auf Grund der geringen Unterschiede in der chemischen Konstitution der Anthrachinonderivate sowie der lösungsvermittelnden Eigenschaften der begleitenden Gerbstoffe nicht möglich gewesen. Diese bei den Isolierungsarbeiten beobachteten Schwierigkeiten, zu reinen kristallinen Glykosiden zu gelangen, veranlaßten A.C. BELLAART¹⁹⁾, sich eingehender mit den Glykosiden des Rheins zu beschäftigen. Um einen Einblick in die chemischen und pharmakologischen Eigenschaften eines Rheinglucosids zu erhalten, synthetisierte er ein bis dahin noch unbekanntes Rheinmonoglucosid²⁰⁾. Erst kürzlich²¹⁾ gelang ihm durch Vergleich seines nach der Hydrolyse erhaltenen Monomethyläthers mit einer von A. STOLL und B. BECKER²²⁾ beschriebenen 8-Hydroxy-1-methoxyanthrachinon-3-carbonsäure der Beweis, daß es sich bei seinem Syntheseprodukt um das Rhein-l-glucosid handelt.

Da ein Teil der pharmakologischen Wirksamkeit des Rhabarbers den Anthrachinonglykosiden zugeschrieben wird, ist die Gewinnung genuiner Glykoside von großem Interesse.

Ziel dieser Arbeit war es, das Rheinglykosid in reiner Form zu isolieren und in seiner Konstitution aufzuklären, um damit eine Möglichkeit zur pharmakologischen Prüfung zu erlangen. Außerdem vermittelt die Kenntnis der Konstitution einen Einblick in die Strukturisomerie von Oxymethylanthrachinonglykosiden, da von den bislang isolierten lediglich das Sennosid in seiner Zuckerstellung aufgeklärt ist. Daneben sollte die kürzlich erörterte Frage der Struktur des Rheins erneut aufgegriffen und geklärt werden.

-
- 15) A. TSCHIRCH u. K. HEUBERGER, Arch. Pharmaz., 240, 596 (1902)
16) E. GILSON, Mém. cour. par l'Acad. roy. méd. Belgique, 1905, S. 455
17) F. TUTIN u. H.W. CLEWER, J. chem. Soc. (London), 99, 946 (1911)
18) A.C. BELLAART, Pharmac. Weekbl., 93, 1077 (1958)
19) A.C. BELLAART, Dissertation, Groningen, 1952
20) A.C. BELLAART, Pharmac. Weekbl., 87, 33 (1952)
21) A.C. BELLAART u. C. KONINGSBERGER, Recueil Trav. chim. Pays-Bas, 79, 285 (1960)
22) A. STOLL u. B. BECKER, Recueil Trav. chim. Pays-Bas, 69, 553 (1950)

ALLGEMEINER TEIL

A. Isolierung der Glykoside

1. Übersicht über Isolierungsmethoden für Anthrachinonglykoside

Um die Glykoside der Anthraderivate in reiner Form zu isolieren, fanden bisher im wesentlichen drei Verfahren Anwendung, die zum Teil auch miteinander kombiniert wurden.

- a) Die bislang gebräuchlichste Darstellungsmethode besteht in einer **Extraktion** der gepulverten Droge mit einem oder mehreren Lösungsmitteln. M. BRIDEL und C. CHARAUX²³⁾ konnten durch alkoholische Extraktion der Frangularinde ein "primäres Frangulaglykosid" in guter Ausbeute gewinnen; T. ANDERSON²⁴⁾ erhielt aus der Wurzelrinde von *Morinda citrifolia* durch Auskochen mit Alkohol das Morindin in kristalliner Form. Andere Glykoside waren nicht so leicht zugänglich und konnten erst nach Vorbehandlung der Droge mit Äther gewonnen werden, wie es von P. SCHWABE²⁵⁾ bei der Darstellung des Frangulins und O. HESSE²⁶⁾ bei Glucochrysaron angegeben ist. In einigen Fällen²⁵⁾²⁷⁾²⁸⁾ ließ sich das reine Glykosid erst nach Ausschütteln der Extraktionslösungen mit Äther oder Chloroform abtrennen. O.A. OESTERLE und E. TISZA²⁹⁾ kommen mit der Verwendung von wässriger schwefeliger Säure bei der Darstellung des Morindins zu guten Ergebnissen. Vielfach führen diese einfachen Extraktionsmethoden jedoch nur zu Stoffgemischen, vor allem, wenn Drogen mit komplexerer Zusammensetzung vorliegen, wie das beim Medizinalrhabarber der Fall ist, denn E. GILSON³⁰⁾ erhielt durch Extraktion mit einem Methanol/Äther-Gemisch lediglich ein

23) M.BRIDEL u. C.CHARAUX, C.R.hebd.Séances Acad.Sci., 192, 1269 (1931)

24) T.ANDERSON, Liebigs Ann.Chem.Pharm., 71, 216 (1849)

25) P.SCHWABE, Arch.Pharmaz., 226, 569 (1888)

26) O.HESSE, Liebigs Ann.Chem., 309, 32 (1899)

27) P.CASPARIS u. R.MAEDER, Schweiz.Apotheker-Ztg., 63, 313 (1925)

28) N.WALLASCHKO u. N.KRASSOWSKI, J.russ.physik.-chem.Ges., 40, 1502, 1510 (1908)

29) O.A.OESTERLE u. E.TISZA, Arch.Pharmaz., 246, 150 (1908)

30) E.GILSON, Mém.cour.par l'Acad.roy.méd.Belgique, 1905, S. 455

aus vier Glykosiden bestehendes Mischkristallisat und A.C. BELLAART³¹⁾ gewann nach Vorbehandlung der gepulverten Rhabarberdroge mit Äther und Azeton aus dem methanolischen Extrakt ebenfalls nur ein Gemisch verschiedener Anthrachinonglykoside.

- b) Zur Reingewinnung schwerer zugänglicher Glykoside wurden vielfach Fällungen über die anorganischen Salze zu Hilfe genommen. P. CASPARIS und R. MAEDER³²⁾ isolierten das Glukofrangulin mit Hilfe einer Bleiazetatfällung. E. SCHUNK und L. MARCHLEWSKI³³⁾ gewannen ihr Rubiadinglykosid ebenfalls über das Bleisalz, während A. STOLL und Mitarbeiter³⁴⁾ nach Kristallisation des Sennosids A aus der Mutterlauge das Sennosid B als schwerlösliches Calciumsalz von den restlichen Ballaststoffen abtrennen konnten.

Da die Fällungsreagenzien ähnlich gebaute Glykoside im gleichen Maße erfassen und der Verlauf der Reaktion nur schwer zu kontrollieren ist, bieten diese Verfahren nur dort einen Vorteil, wo eine Abtrennung einzelner Glykoside von Ballaststoffen erforderlich ist.

- c) Während die Gegenstromverteilung³⁵⁾ zur Auftrennung der Anthrachinonglykoside nur mit geringem Erfolg angewandt wurde, hat sich die chromatographische Adsorptionsanalyse immer mehr durchsetzen können. So verwandten W. ZINN³⁶⁾ bei der Untersuchung der Aloe als Adsorptionsmittel "Aktives Bariumsulfat" und P. FISCHER-JØRGENSEN³⁷⁾ bei seinen Isolierungsversuchen aus der Frangularinde Calciumcarbonat. Sehr eingehend befaßten sich O.E. SCHULTZ und G. MAYER³⁸⁾ mit den bis dahin bekannten

31) A.C.BELLAART, Pharmac.Weekbl., 93, 1077 (1958)

32) P.CASPARIS u. R.MAEDER, Schweiz.Apotheker-Ztg., 63, 313 (1925)

33) E.SCHUNK u. L.MARCHLEWSKI, J.chem.Soc. (London), 63, 969, 1173 (1893)

34) A.STOLL, B.BECKER u. W.KUSSMAUL, Helv.chim.Acta, 32, 1892 (1949)

35) G.M.NANO, Pharmac.Acta Helvetiae, 35, 451 (1960)

36) W.ZINN, Dissertation, Zürich 1945

37) P.FISCHER-JØRGENSEN, Dissertation, Kopenhagen 1948

38) O.E.SCHULTZ u. G.MAYER, Arzneimittelforsch., 6, 334 (1956)

Verfahren der Adsorptions- und Ionenaustauschchromatographie und studierten deren allgemeine Verwendbarkeit an der Reindarstellung eines Rheum-Emodin-Glykosids. Sie untersuchten eine Anzahl saurer, neutraler und basischer Adsorptionsmittel, von denen sie wegen der adsorptiven Eigenschaften Magnesol bevorzugten, denn nach Durchlauf durch zwei Magnesolsäulen konnte aus der Lösung das reine Glykosid kristallisieren. Bei Verwendung anderer Adsorbentien, wie Neutralon und Aluminiumoxyd, hatten sie mit einer vorgeschalteten Ionenaustauschersäule zur Abtrennung der Ballaststoffe gute Erfahrungen machen können. Wie aus ihren papierchromatographischen Untersuchungen allerdings hervorgeht, waren in der Blattdroge von Rheum undulatum keine größeren Mengen Gerbstoffe vorhanden. Dieser Umstand, sowie die Gegenwart nur eines Anthrachinonglykosids, gestattete die Verwendung dieses basischen Adsorbens mit guten Ergebnissen.

Ihre Erfolge zeigten die prinzipielle Verwendbarkeit der Adsorptionschromatographie zur Isolierung von Anthrachinonglykosiden. Zur Auftrennung mehrerer ähnlich gebauter Glykoside, die von größeren Gerbstoffmengen begleitet werden, wie z.B. bei Rheum palmatum, sind jedoch die bislang zur Isolierung von Anthrachinonglykosiden verwandten Adsorbentien nicht geeignet. Deshalb war hier die Wahl stärkerer Adsorptionsmittel erforderlich.

Eigene Untersuchungen

2. Papierchromatographische Voruntersuchungen

Für die Ausarbeitung neuer Isolierungsmethoden war zunächst die Wahl eines Fließmittels erforderlich, das die Anthrachinonglykoside (insbesondere die Rheinglykoside) auf dem Papierchromatogramm scharf und deutlich voneinander trennt. Wir untersuchten verschiedene in der Literatur beschriebene Systeme auf ihre Trenneigenschaften gegenüber den Rheinglykosiden (siehe Tabelle 1). In dieser Aufstellung bleiben Laufsysteme unberücksichtigt, bei deren Untersuchung keine Zuordnung der Flecke

vorgenommen worden war oder keine Angaben über R_f -Werte vorlagen³⁹⁾⁴⁰⁾.

T a b e l l e 1

Übersicht über verschiedene Fließmittel zur Auftrennung der Anthrachinonglykoside

	System	Zahl der Rheingly- kosid- fleckchen	R_f -Werte	Autor
I	Butanol 5	3	0.09	E.SCHRATZ und H.J.VETHACKE ⁴¹⁾
	Methanol 5		0.13	
	Wasser 2		0.15	
II	Wasserges.	2	0.035	E.W.NEUHOFF und ⁴²⁾ H.AUTERHOFF
	Butanol		0.05	
III	Wasserges.	3	0.03	Dissertation ⁴³⁾ I.KÖHLER
	Butanol		0.08	
			0.35	
IV	Butanol 4	1	0.50	Dissertation ⁴³⁾ I.KÖHLER
	Eisessig 1			
	Wasser 5			
V	n-Propanol 4	2	0.21 0.41	L.HÖRHAMMER, H.WAGNER ⁴⁴⁾ und H.LEUE
	Äthylazetat 3			
	Wasser 3			

Die R_f -Werte der Rheinglykosidflecken liegen bei den ersten drei Systemen, deren Zusammensetzung sehr ähnlich ist, sehr niedrig und eng beieinander und sind daher für unsere Untersuchung nicht geeignet. Im PARTRIDGE-Gemisch (IV) ist nur ein Fleck als Rhein-haltiges Glykosid festzustellen; in den neutralen Systemen sind wenigstens zwei beschrieben, was auf eine geringe Stabilität eines Glykosides im sauren Milieu schließen läßt. Wir konnten bei unseren Untersuchungen eben-

39) A.C.BELLAART, Pharmac.Weekbl., 93, 1077 (1958)

40) W.LANG, Dtsch.Apotheker-Ztg., 91, 125 (1951)

41) E.SCHRATZ u. H.J.VETHACKE, Planta medica, 6, 44 (1958)

42) E.W.NEUHOFF u. H.AUTERHOFF, Dtsch.Apotheker-Ztg., 94, 541 (1954)

43) I.KÖHLER, Dissertation, München 1958

44) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u. H.LEUE, Dtsch.Apotheker-Ztg., 99, 1043 (1959)

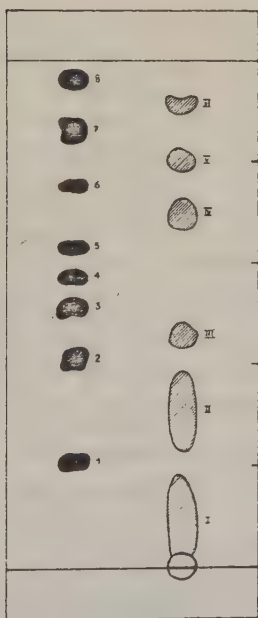
falls diese Beobachtung machen und werden in einem späteren Teil der Arbeit noch darauf eingehen.

Von den untersuchten Systemen wies das von E. MERCK⁴⁵⁾ angegebene und von uns in seinem Volumverhältnis veränderte Laufsystem (V) bei den Rheinglykosiden sehr gute Trenneigenschaften auf.

Papierchromatographie des Rheumextraktes

Die Chromatographie eines auf kaltem Wege bereiteten methanolischen Extraktes der Rhizomteile von *Rheum palmatum* L. var. *tanguticum* Max.^{*)} ließ auf dem unbehandelten Chromatogramm unter UV-Licht acht orange bis gelb fluoreszierende Flecke erkennen, zwischen denen im unteren Teil des Chromatogramms überwiegend braune, im oberen Teil blaue und türkisfarbene Flecke eingestreut waren (siehe Abb. 1).

Abb. 1



Laufmittel:

n-Propanol/Äthylazetat/Wasser
4:3:3, aufsteigend, besprüht
mit 1%iger methanolischer Mag-
nesiumazetatlösung

Papierchromatographische Auf-
trennung eines Methanolextrak-
tes von *Rheum palmatum* L.

Auswertung des Chromatogramms
siehe Tabelle 2.

⁴⁵⁾ E.MERCK, Chromatographie, Darmstadt 1958, S. 80, Tafel 7

^{*)} gepulverte Handelsdroge der Fa. CAESAR u. LORETZ K.G., Hilden/Rhld.

Eine ausführliche papierchromatographische Untersuchung über die Inhaltsstoffe der Rhabarberdroge hatten wir schon früher⁴⁶⁾ durchgeführt, wobei eine teilweise Auftrennung der Anthrachinonderivate durch Chromatographie über Polyamidsäulen gelungen war. Durch Wahl verschiedener Elutionsmittel (Wasser, Wasser/Methanol-Gemische und n/2 Kalilauge) hatten wir in einem Arbeitsgang geringe Mengen von Anthrachinonglykosiden gewinnen können, die zunächst zur papierchromatographischen Identifizierung der einzelnen Flecke verwandt wurden.

Die nachfolgende Tabelle gibt eine Übersicht über deren R_F -Werte und über das Verhalten im UV-Licht sowie der Zuordnung der Anthrachinonflecke zu den entsprechenden Aglykonen (siehe Tabelle 2).

T a b e l l e 2

Auswertung des chromatographischen Bildes eines Methanol-extraktes von *Rheum palmatum* L. var. *tanguticum* Max. (Abb.1).

Fleck	R_F -Wert	Farbe im UV-Licht	Zuordnung
I		braun	Gerbstoffe
1	0.21	orange	Rheinglykosid
II		braun	Gerbstoffe
2	0.41	orange	Rheinglykosid
III		türkis	
3	0.51	hellorange	Aloe-Emodin-Glykosid
4	0.57	orange	Chrysophanolglykosid
5	0.63	fahlgelb	Rheinaglykon
IV		hellgrün	
6	0.75	gelb	Aloe-Emodin-Glykosid
V		ocker	
7	0.86	orange	Chrysophanol-Glykoside Rheum-Emodin-
VI		blau	
8	0.96	gelb	freie Anthrachinone

46) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u.H.LEUE, Dtsch.Apotheker-Ztg. 99, 1043 (1959)

Nach diesen Untersuchungen gelten die Flecken mit den R_f -Werten 0.21 (Glykosid B) und 0.41 (Glykosid A) als Rheinglykoside, was mit unseren Feststellungen übereinstimmt. Damit war eine papierchromatographische Methode für die Verfolgung der Isolierungsarbeiten zur präparativen Gewinnung der Rheinglykoside gefunden.

3. Isolierung des Glykosids A

Zur E x t r a k t b e r e i t u n g perkolierten wir wir Rhizoma Rhei sinensis pulv. im Soxhlet-Apparat erschöpfend mit Methanol, das schon von verschiedenen Autoren⁴⁷⁾⁴⁸⁾⁴⁹⁾ als Extraktionsmittel zur Gewinnung von Anthrachinonglykosiden verwandt worden war. Damit wurden alle Anthrachinonderivate in freier und gebundener Form quantitativ aus dem Drogenpulver herausgelöst. In dem so bereiteten Extrakt war jedoch auch der größte Teil des Gerbstoffes enthalten.

Das bislang übliche Verfahren, den Gerbstoff durch Fällung mittels Gelatinelösung oder anderen Fällungsreagenzien zu entfernen, war nicht geeignet, da sich bei Voruntersuchungen herausgestellt hatte, daß eine quantitative Abtrennung des Gerbstoffes nicht zu erreichen war und ein Teil der Glykoside vom Niederschlag eingeschlossen wurde. Auch eine Fällung der Glykoside mit Bleiazetatlösung erwies sich wegen der damit verbundenen Substanzverluste als unbrauchbar. Wir stützten uns daher auf die Erfahrungen von O.E. SCHULTZ und G. MAYER⁵⁰⁾ und versuchten, die Gerbstoffe mit Hilfe säulenchromatographischer Verfahren zu entfernen. Die komplizierte Zusammensetzung des Medizinalrhabarbers machte allerdings die Wahl neuer Adsorbentien erforderlich.

Wir entschieden uns für P o l y a m i d p u l v e r , dessen Adsorptionseigenschaften gegenüber Phenolkörpern schon

47) A. TSCHIRCH u. K. HEUBERGER, Arch. Pharmaz., 240, 596 (1902)

48) F. TUTIN u. H. W. B. CLEWER, J. chem. Soc. (London), 99, 946 (1911)

49) A. C. BELLAART, Dissertation, Groningen 1952

50) O. E. SCHULTZ u. G. MAYER, Arzneimittelforsch., 6, 334, (1956)

mehrfach zur Abtrennung von Gerbstoffen⁵¹⁾⁵²⁾, sowie zur Reindarstellung von Flavonen⁵³⁾⁵⁴⁾⁵⁵⁾ mit gutem Erfolg benutzt worden waren. Zur Isolierung der Rhabarberinhaltsstoffe wurde die Polyamidchromatographie erstmalig von V. CARELLI und R. GIULIANO⁵⁶⁾ herangezogen, denen auf diesem Wege die Auftrennung der Anthrachinonaglykone gelang.

Polyamidchromatographie

Der durch Filtration von ausgeschiedenem Gerbstoff befreite Extrakt wurde auf die Säule aufgebracht und zunächst mit Methanol eluiert. Es konnte keine befriedigende Trennung erreicht werden. Die geringe Laufstrecke der Glykoside A und B auf dem Papierchromatogramm und die Affinität zu den Gerbstoffen ließen uns als hydrophileres Laufmittel Wasser wählen. Hierbei wurde ein großer Teil des Gerbstoffes in der Säule zurückgehalten. Da allerdings die Glykoside noch nicht in genügender Reinheit erhalten wurden, versuchten wir zunächst, eine möglichst quantitative Abtrennung von den anderen Anthrachinonglykosiden zu erzielen. Bei dieser Vorfraktionierung konnte das Glykosid A (R_F -Wert 0.41) gut von den anderen Anthrachinonbestandteilen abgetrennt werden. Lediglich das Glykosid 3 (R_F -Wert 0.51) fand sich als ständiger Begleiter in fast allen Fraktionen vor.

Auf den Chromatogrammen war das tiefer liegende Rheinglykosid B (R_F -Wert 0.21) nicht mehr oder nur noch in geringen Spuren feststellbar. Wir begannen zunächst mit der Isolierung des Glykosids A. Da der verbleibende Gerbstoffrest eine direkte Kristallisation der Glykoside nicht zuließ, suchten wir nach einer Methode, die eine vollständige Abtrennung der Gerbstoffe bei möglichst gering bleibenden Verlusten an

-
- 51) W. GRASSMANN, H. HÖRMANN u. A. HARTL, Makromolekulare Chem., 21, 37 (1956)
52) W. GRASSMANN, H. ENDRES, W. PAUCKNER u. H. MATHES, Chem. Ber., 90, 1125 (1957)
53) L. HÖRHAMMER, I. IZQUIERDO-SORLI, H. WAGNER u. H. ENDRES, Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges., 291/63, 269 (1958)
54) L. HÖRHAMMER, H. WAGNER u. W. LEEB, Naturwissenschaften, 44, 513, (1957)
55) L. HÖRHAMMER, H. WAGNER u. W. LEEB, Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges., 293/65, 264 (1960)
56) V. CARELLI u. R. GIULIANO, Farmaco (Pavia), 12, 184 (1957)

Anthrachinonglykosiden gewährleistete. Ein Reinigungsprozeß über mehrere Polyamidsäulen führte zwar zum Erfolg, hatte aber den Nachteil eines großen Arbeitsaufwandes.

Ionenaustauscherchromatographie

Wir bedienten uns der Chromatographie mit Hilfe von Ionenaustauscherharzen, die schon von O.E. SCHULTZ und G. MAYER⁵⁷⁾ zur Reindarstellung von Anthrachinonglykosiden mit gutem Erfolg verwandt worden waren. Die Säurenatur der Anthrachinonglykoside ließ nur basische Austauscherharze, sog. Anionenaustauscher (AAT), in Frage kommen. Nach dem Reaktionsschema



werden die organischen Säuren reversibel ausgetauscht. Die Wahl eines geeigneten Anionenaustauschers richtet sich nach der Säurestärke. O.E. SCHULTZ untersuchte einige Harze unterschiedlicher Kapazität auf ihr Verhalten gegenüber Rheum-Emodin-Glykosid und entschied sich für den stark basischen Typ. Nach seinen Angaben war mit einer geringfügigen Spaltung der Glykoside zu rechnen.

Die vereinigten Fraktionen der Säulenelution wurden über den stark basischen Anionenaustauscher "AMBERLITE IRA 400" (Austauschkapazität: 3.0 mÄq/gr.) gegeben. Dabei wurden die Anthrachinonglykoside vom Harz festgehalten, während die wässrige Lösung des Durchlaufes nur die Gerbstoffe enthielt. In dieser Lösung waren papierchromatographisch keine Anthrachinonderivate feststellbar.

Zur A b l ö s u n g der Glykoside vom Austauscherharz verwandten wir ebenso wie O.E. SCHULTZ Eisessig. Wir konnten dabei entsprechend seinen Beobachtungen feststellen, daß sich der Hauptteil des Glykosids A im ersten Drittel des abtropfenden Eluats befand. Das papierchromatographische Bild zeigte lediglich die Anwesenheit der Anthraglykoside; Gerbstoffe waren nicht festzustellen. Da Eisessig als ausgezeichnetes Hy-

57) O.E.SCHULTZ u. G.MAYER, Arzneimittelforsch., 6, 334 (1956)

drolysenmedium für Anthrachinonglykoside⁵⁸⁾ gilt, bestand die Gefahr einer Spaltung des Glykosids. Wir konnten aber feststellen, daß sich die Lösungen in der Tiefkühltruhe bei -27°C auch über mehrere Tage unzersetzt hielten.

Die Aufbereitung des Glykosids A aus der Eisessiglösung konnte daher auch nur auf dem sehr schonenden Wege der Gefrieretrocknung erfolgen, da bei der Vakuumsublimation des Eisessigs bei sehr tiefen Temperaturen eine hydrolytische Spaltung der Glykoside nicht zu erwarten war.

Reinigung des Glykosids A

Der erhaltene Rückstand wurde in Methanol gelöst. Die Lösung zeigte papierchromatographisch in der Hauptsache das gesuchte Glykosid A neben Verunreinigungen durch das Glykosid 3 und geringen Mengen einer blau fluoreszierenden Substanz in etwa gleicher Laufhöhe. Wir reinigten das Eluat durch Chromatographie über eine Perlonsäule.

Vorversuche dazu hatten ergeben, daß sich die Löslichkeitsverhältnisse in der Glykosidlösung verändert hatten. Während bei der Chromatographie des Rheumgesamtexttraktes über eine Polyamidsäule das Glykosid A fast mit der Front des Lösungsmittels (Methanol) gelaufen war, konnten wir nun nach Entfernung des Gerbstoffes eine nur geringe Wanderungsgeschwindigkeit feststellen. Wegen der dabei beobachteten guten Trennungseigenschaften genügte eine geringe Füllhöhe der Säule, deren Kapazität wir durch Erweiterung des Durchmessers erhöhten. Der Durchlauf erfolgte hierbei rasch. In einigen Fällen genügte eine Säule, gelegentlich war eine zweite Fraktionierung erforderlich. Aus den so gereinigten Lösungen konnte das Glykosid A in Form hellgelber, mikrokristalliner Nadeln gewonnen werden, die nach dem Umkristallisieren aus Methanol/Wasser einen Zersetzungspunkt von $266 - 270^{\circ}\text{C}$ hatten. Die Ausbeute betrug 80 mg, entsprechend 0.016%.

58) H.AUTERHOFF, Dtsch.Apotheker-Ztg., 91, 415 (1951)

4. Versuche zur Gewinnung des Glykosids B

Das papierchromatographische Bild eines kalt bereiteten alkoholischen Rhabarberauszuges (siehe Seite 8 u. 7) hatte die Anwesenheit eines zweiten Glykosids mit Rheincharakter (Glykosid B, R_F -Wert 0.21) gezeigt. Bei unseren Isolierungsversuchen am Glykosid A war jedoch das tiefer liegende Glykosid sehr bald nicht mehr in der Lösung feststellbar. Für das Fehlen des Glykosids nach der ersten Fraktionierung des Extraktes über eine Perlonsäule waren zwei Möglichkeiten gegeben:

1. konnte eine vollständige Adsorption an Polyamid erfolgt und eine nachfolgende Desorption verhindert sein,

2. konnte sich das native Glykosid aufgespalten haben. Gegen die erste Möglichkeit sprechen die Feststellungen, die W. GRASSMANN, H. HÖRMANN und A. HARTL⁵⁹⁾ über die reversible Aufnahme von Phenolen an Polyamid machen konnten. Bei Berücksichtigung unserer Erfahrungen über die Desorptionseigenschaften des Rheinglykosids A sowie anderer Anthrachinonglykoside war außerdem eine irreversible Aufnahme des Glykosids B vom Polyamid nicht wahrscheinlich. Somit war anzunehmen, daß eine Aufspaltung für das Verschwinden des Glykosids verantwortlich war.

Eine Isolierung der geringen Mengen des Glykosids B wurde zunächst mit Hilfe der präparativen Papierchromatographie versucht. Die entsprechenden Zonen mehrerer Streifenchromatogramme wurden ausgeschnitten und mit heißem Methanol eluiert. Das chromatographische Bild dieser Lösung zeigte allerdings nur noch geringe Spuren von Glykosid B, während die Hauptmenge in das Glykosid A übergegangen war. Damit war der Beweis erbracht, daß bei der Aufbereitung der Anthrachinonglykoside eine Aufspaltung des Glykosids B dessen Isolierung stets verhindert hatte. Der Grund für diese Aufspaltung muß in der erhöhten Temperatur hierbei gesucht werden. Die Darstellung einer reinen Lösung des Glykosids B aus Papierstreifen war auch dadurch erschwert,

59) W. GRASSMANN, H. HÖRMANN u. A. HARTL, Makromolekulare Chem., 21, 37 (1956)

daß sich bei diesem Verfahren stets Zellulosefasern vom Papier ablösten.

Wir übertrugen daher das Verfahren einer präparativen Isolierung auf Kieselgelplatten nach E.STAHL⁶⁰⁾ Eine kalt bereitete methanolische Lösung von Rhabarberpulver wurde strichförmig auf die Startlinie der Platte aufgetragen. Wir bedienten uns damit einer schon von F. SCHLEMMER und E. LINK⁶¹⁾ zur Bestimmung des Reserpins angewandten Methode, die sich sehr gut auf die Abtrennung des Glykosids B übertragen ließ. Nach vorsichtigem Abnehmen der das Glykosid B enthalten- den Kieselgelschicht konnte durch Schütteln mit Methanol und Zentrifugieren eine papierchromatographisch reine Lösung des Glykosids gewonnen werden, jedoch war wegen der stark hydrophilen Eigenschaften des Glykosids B zu erwarten, daß bei der Gewinnung geringe Spuren Gerbstoff miteluiert waren. Es war daher auch nicht möglich, das Glykosid aus der Lösung zu kristallisieren. Eine chromatographische Abtrennung des Gerbstoffes konnte aus Substanzmangel nicht durchgeführt werden. Zur Identifizierung stand uns deshalb das Glykosid B nur als konzentrierte methanolische Lösung zur Verfügung.

B. Strukturaufklärung der Glykoside

1. Identifizierung des Glykosids A

Charakterisierung des Glykosids A (Physikalische Daten)

Das Glykosid stellt eine sehr feinkristalline schwach gelbe Substanz dar. Ein exakter Schmelzpunkt ist nicht zu erhalten. Bei einer Temperatur von 266 - 270°C beginnt sich die Substanz unter starker Verfärbung nach Braun bis Dunkelbraun zu zersetzen. Es verbleibt ein dunkelgefärbter Rückstand.

Die Löslichkeit in Äthanol und Methanol ist ziemlich gut, in Äther und Azeton ist es wenig löslich, in Wasser, Chloroform und Äthylazetat unlöslich.

60) E.STAHL, Chemiker-Ztg., 82, 323 (1958)

61) F.SCHLEMMER u. E.LINK, Pharmaz.Ztg., 104, 1349 (1959)

Die Elementaranalyse ergab für das Glykosid A 56.23% C und 4.41% H. Der prozentuale Anteil an Kohlenstoff und Wasserstoff entspricht damit den für Anthrachinonmoglykoside berechneten Werten. Die Verbrennung hinterließ keinen Rückstand.

Vergleich der UV-Spektren des Glykosids A mit anderen Anthrachinonglykosiden

Da uns nur wenig Substanz zur Verfügung stand, zogen wir zur ersten näheren Charakterisierung der isolierten Substanz die UV-Spektren anderer Anthrachinonglykoside^{*)}, an deren Strukturaufklärung zur Zeit gearbeitet wird⁶²⁾, zum Vergleich heran. Diese weisen in methanolischer Lösung drei charakteristische Maxima auf, und zwar in den Bereichen 222 - 226 m μ (Max_I), 255 - 284 m μ (Max_{II}) und 410 - 423 m μ (Max_{III}), wie aus der Tabelle 3 hervorgeht.

T a b e l l e 3

Zusammenstellung der Maxima der UV-Spektren von 1,8-Dihydroxyanthrachinonglykosiden in Methanol. Gemessen im Zeiss Opton-Spektralphotometer M Q 4

Substanz	Smp.	Max _I m μ	Max _{II} m μ	Max _{III} m μ
Rheum-Emodin Glykosid	196-197°	222	284	423
Physcion Glykosid	229-230°	222	271	420
Chrysophanol Glykosid	245°	223	258	411
Aloe-Emodin Glykosid	230-231°	224	255	410
Glykosid A (Rhein Glykosid)	266-270°	226	258	410

Das Maximum I liegt bei allen aufgeführten Glykosiden konstant bei etwa 224 m μ . Auffallend jedoch ist, daß die Absorptionsmaxima II und III beim Physcion- und Rheum-Emodin Glykosid in den längerwelligen Bereich verschoben sind (Max_{II} 271 - 284 m μ und Max_{III} 420 - 423 m μ), während sie bei den Glykosiden der

*) Wir danken Herrn H. LEUE für die Überlassung der Substanzen.

62) H.LEUE, Dissertation (München), in Vorbereitung

Chrysophansäure und des Aloe-Emodins in ihrer Bandenlage sehr gut übereinstimmen (siehe Abb. 2 und 3). Ein Vergleich der Formelbilder läßt einen direkten Zusammenhang zwischen der Konstitution und den Spektren der Anthrachinonglykoside erkennen (siehe Tabelle 4):

T a b e l l e 4

Übersicht über die Substituenten in C₃- bzw. C₆-Stellung bei 1,8-Dihydroxyanthrachinonglykosiden

Substanz	Substituenten in C ₃	Substituenten in C ₆	Max _{II} mμ	Max _{III} mμ
Rheum-Emodin Glykosid	-CH ₃	-OH	284	423
Physcion Glykosid	-CH ₃	-OCH ₃	271	420
Chrysophanol Glykosid	-CH ₃	-	258	411
Aloe-Emodin Glykosid	-CH ₂ OH	-	255	410
Rhein Glykosid	-COOH	-	258	410

Die Anthrachinonglykoside, die also außer den Hydroxylgruppen in C₁- bzw. C₈-Stellung nur noch einen Substituenten (am C₃-Atom) haben, weisen übereinstimmend Maxima bei 255 - 258 mμ (Max_{II}) und 410 - 411 mμ (Max_{III}) auf. Bei den Glykosiden mit zwei Substituenten in C₃- bzw. C₆-Stellung (Physcion- und Rheum-Emodin-Glykosid) sind demgegenüber die Maxima II nach 271 - 284 mμ und III nach 420 - 423 mμ verschoben.

Die Lage der Maxima des Glykosids A (Max_{II} 258 mμ und Max_{III} 410 mμ) weist darauf hin, daß es nur ein Glykosid mit einem Substituenten am C₃-Atom (Rheinglykosid) sein kann. Das erste Maximum (226 mμ) stimmt mit dem der anderen Glykoside überein.

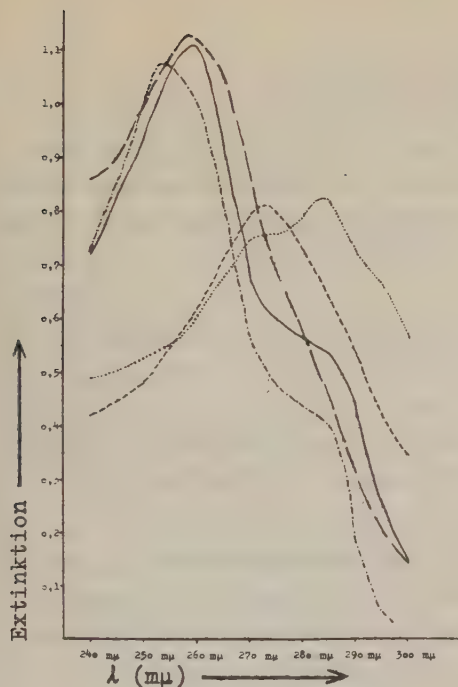


Abb. 2

Vergleich der UV-Spektren im Bereich von 240 mμ - 300 mμ

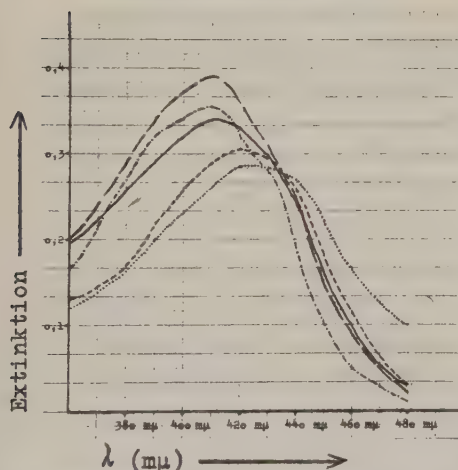


Abb. 3

Vergleich der UV-Spektren im Bereich von 360 mμ - 480 mμ

UV-Spektren verschiedener 1,8-Dihydroxyanthrachinonglykoside im Bereich von 240 mμ - 300 mμ und 360 mμ - 480 mμ.
Gemessen in methanolischer Lösung im Zeiss Opton-Spektralphotometer M Q 4.

- Chrysophanol Glykosid
- .-.-.-.- Aloe-Emodin Glykosid
- Rhein Glykosid
- Physcion Glykosid
- Rheum-Emodin Glykosid

Hydrolyse und Identifizierung des Aglykons

Ein halbstündiges Erhitzen mit 2,5%iger Salzsäure, mit Eisessig sowie mit 8n Schwefelsäure führte zu einer vollständigen Hydrolyse des Glykosids. Das ausgefallene Aglykon wurde durch Umkristallisieren und Sublimieren gereinigt und wies einen Schmelzpunkt von 310 - 313°C auf.

Zur papierchromatographischen Identifizierung verglichen wir die R_F -Werte des erhaltenen Aglykons mit authentischem Rhein in verschiedenen Lösungsmittelsystemen. Sowohl im R_F -Wert als auch im Verhalten bei Tageslicht und unter der UV-Lampe im unbesprühten Zustand sowie nach dem Besprühen mit KOH waren sie identisch.

Der Schmelzpunkt des gereinigten und sublimierten Aglykons beträgt 310 - 313°C (Kofler-Heizbank), wobei gleichzeitig starke Sublimationserscheinungen zu beobachten waren. Der Mischschmelzpunkt mit authentischem Rhein zeigte keine Depression.

Die Schwierigkeiten bei der Ermittlung eines exakten Schmelzpunktes für Rhein sind allgemein bekannt, denn die in der Literatur gemachten Angaben hierüber schwanken zwischen 309° und 329°C (Tabelle 5).

T a b e l l e 5

Zusammenstellung verschiedener Schmelzpunkte des Rheins

Autoren		Schmelzpunkte
E.SCHRATZ u. H.J.VETHACKE ⁶³⁾	1958	318°
R.ROBINSON u. J.L.SIMONSEN ⁶⁴⁾	1909	310°
M.ANCHEL ⁶⁵⁾	1949	326° - 329°
A.C.BELLAART ⁶⁶⁾	1952	321° - 322°
H.HAUPTMANN u. L.LACERDA NAZARIO ⁶⁷⁾	1950	309° - 310°
O.HESSE ⁶⁸⁾	1908	312° - 316°
F.K.MODI u. M.L.KHORANA ⁶⁹⁾	1952	313° - 316°
O.A.OESTERLE u. E.TISZA ⁷⁰⁾	1908	321° - 321.5°

Verschiedene Autoren weisen auf die im Temperaturbereich des Rheinschmelzpunktes beobachteten Erscheinungen hin. O.HESSE gibt seinen Schmelzpunkt unter Sublimation an und F.K. MODI und M.L. KHORANA stellen Zersetzungserscheinungen fest.

Auch bei unseren Untersuchungen setzte ca. 20° unter der Schmelztemperatur Sublimation ein. Wir konnten somit die Beobachtungen HESSE's bestätigen. Bei raschem Erhitzen ließ sich jedoch ein Schmelzen der bei erhöhter Temperatur dunkler werdenden Substanz gut feststellen. Aus diesen Gründen ist verständlich, daß sich nur ein Temperaturintervall als Schmelzbereich angeben läßt.

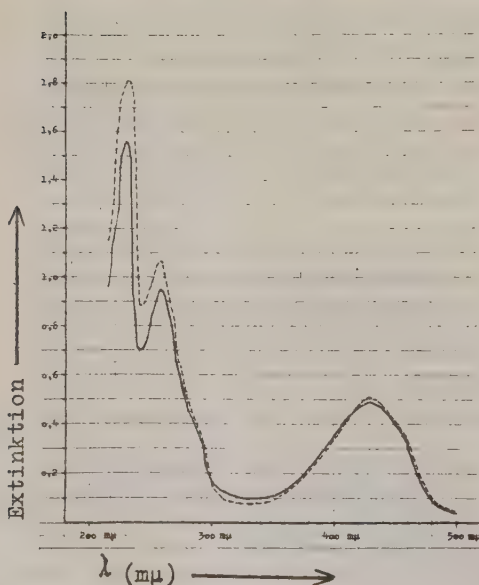
Die E l e m e n t a r a n a l y s e erbrachte mit 62.34% C und 2.53% H Werte für Kohlenstoff und Wasserstoff, die erheblich von den berechneten Werten des "Dirhein" von L. HÖRHAMMER, H.WAGNER und I. KÖHLER⁷¹⁾ (67.16% C, 2.97% H) abwichen. Das von uns erhaltene Rheinaglykon war in allen übrigen Eigenschaften identisch sowohl mit "Dirhein" als auch

- 63) E.SCHRATZ u. H.J.VETHACKE, *Planta medica*, 6, 44 (1958)
 64) R.ROBINSON u. J.L.SIMONSEN, *J.chem.Soc. (London)*, 95, 1085 (1909)
 65) M.ANCHEL, *J.Biol.Chemistry*, 177, 169 (1949)
 66) A.C.BELLAART, *Pharmac.Weekbl.*, 87, 33 (1952)
 67) H.HAUPTMANN u. L.LACERDA NAZARIO, *J.Amer.chem.Soc.*, 72, 1492 (1950)
 68) O.HESSE, *J.prakt.Chem.*, 77, 383 (1908)
 69) F.K.MODI u. M.L.KHORANA, *Indian J.Pharmac.*, 14, 61 (1952)
 70) O.A.OESTERLE u. E.TISZA, *Schweiz.Wschr.Chem.Pharmaz.*, 46, 702 (1908)
 71) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u. I.KÖHLER, *Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharmaz.Ges.*, 292/64, 591 (1959)

mit dem in der Literatur beschriebenen OESTERLE'schen Rhein⁷²⁾. Lediglich die CH-Werte trafen eher auf ein monomeres Rhein (63.38% C, 2.82% H) zu als auf das "Dirhein". Es war also möglich, daß dem Rhein entgegen der Annahme I. KÖHLER's⁷³⁾ doch eine monomere Struktur zukam, wie bisher allgemein formuliert worden war.

Die Ultraviolet t - S p e k t r e n zeigen in methanolischer und alkalischer Lösung den für Anthrachinone typischen Verlauf. In Methanol weist die Rheinkurve drei Maxima auf (Max_I 228 m μ , Max_{II} 257 m μ und Max_{III} 430 m μ). Bei Zusatz von Alkalien verursacht die Bildung eines inneren Komplexsalzes zwischen den Carbonyl- und den α -Hydroxylgruppen eine bathochrome Verschiebung der Maxima, die im sichtbaren Bereich am deutlichsten wird. Dementsprechend findet sich ein besonders stark ausgeprägtes Maximum bei 235 m μ und ein schwächeres bei 510 m μ . Nur noch andeutungsweise ist dagegen ein Maximum bei 385 m μ festzustellen.

Abb. 4



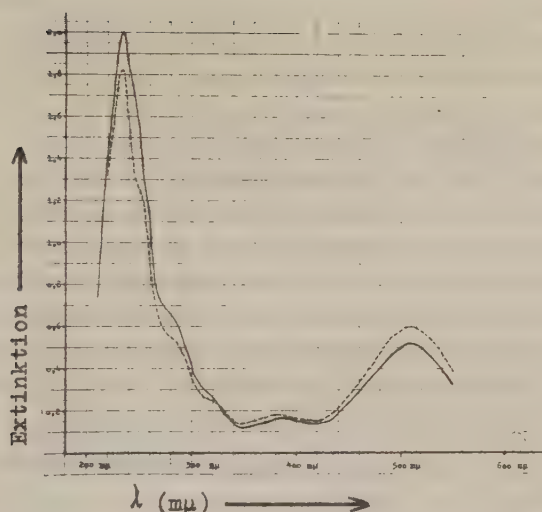
Die Abbildungen 4 und 5 zeigen einen Vergleich der Spektren des isolierten Aglykons mit authentischem Rhein. Ihre Übereinstimmung in Methanol und in n/100 methanolischer Kalilauge deutet auf die Identität beider Substanzen hin.

Vergleich der UV-Absorptionsspektren des Aglykons A mit Rhein in Methanol. Aufgenommen mit dem Zeiss Opton-Spektralphotometer MQ 4
 ----- Aglykon A
 ————— Rhein

72) O.A.OESTERLE, Arch.Pharmaz., 250, 300 (1912)

73) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u. I.KÖHLER, Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharmaz. Ges., 292/64, 591 (1959)

Abb. 5



Vergleich der UV-Absorptionsspektren des Aglykons A mit Rhein in n/100 methanol. Kalilauge. Aufgenommen mit dem Zeiss Opton-Spektralphotometer M Q 4

----- Aglykon A ————— Rhein

Entsprechend unseren Beobachtungen bei Anthrachinonglykosiden über den Einfluß zusätzlicher Substituenten in C₆-Stellung auf die Lage der Maxima untersuchten wir auch die UV-Absorptionsspektren (siehe Tabelle 6) ihrer Aglykone.

T a b e l l e 6

Zusammenstellung der Maxima von UV-Spektren von 1,8-Dihydroxyanthrachinonen in Methanol. Gemessen im Zeiss Opton-Spektralphotometer M Q 4

Substanz	Max _{mμ^I}	Max _{mμ^{II}}	Max _{mμ^{III}}	Max _{mμ^{IV}}	Max _{mμ^V}
Chrysophanol	227	256	—	288	430
Aloe-Emodin	224	255	—	288	430
Rhein	230	258	—	—	430
Physcion	226	(255)	265	288	433
Rheum-Emodin	223	253	(265)	288	435

Diese Spektren weisen in methanolischer Lösung wenigstens vier Maxima auf, wobei die Kurve des Rheins entsprechend den Angaben von E. SCHRATZ und H.J. VETHACKE⁷⁴⁾ einen abweichenden Verlauf hat, da anstelle des Maximums IV nur eine geringe Inflexion auftritt. Die Maxima I (224 - 230 m μ), II (253 - 258 m μ) und IV (288 m μ) stimmen in ihrer Lage im wesentlichen überein. Die bei den Glykosiden des Rheum-Emodins und des Physcions beobachtete Verlagerung der Maxima II und III findet sich bei ihren Aglykonen ebenfalls, allerdings nur im sichtbaren Bereich und weniger stark ausgeprägt (3 - 5 m μ statt 15 - 20 m μ bei den Glykosiden). Während das Maximum V bei Chrysophanol, Aloe-Emodin und Rhein übereinstimmend bei 430 m μ liegt, befindet sich das gleiche Maximum des Physcions und des Rheum-Emodins bei 433 m μ bzw. 435 m μ . Ferner tritt bei diesen beiden Anthrachinonen bei 265 m μ ein zusätzliches schwaches Maximum auf, das den übrigen Anthrachinonen mit nur einem Substituenten (am C₃-Atom) fehlt.

Diese bathochrome Verschiebung der Maxima läßt also bei den untersuchten Anthrachinonen Rückschlüsse auf zusätzliche Substituenten 1. Ordnung in β -Stellung zu, wobei offensichtlich die Verglykosidierung der α -Hydroxylgruppen diesen Effekt verstärkt, wie aus der Untersuchung der Anthrachinonglykosidspektren (siehe Seite 16) hervorgeht.

Beim Vergleich der Infrarotspektren konnten wir Übereinstimmung des untersuchten Aglykons mit dem eines authentischen Rheins feststellen (siehe Abb. 6).

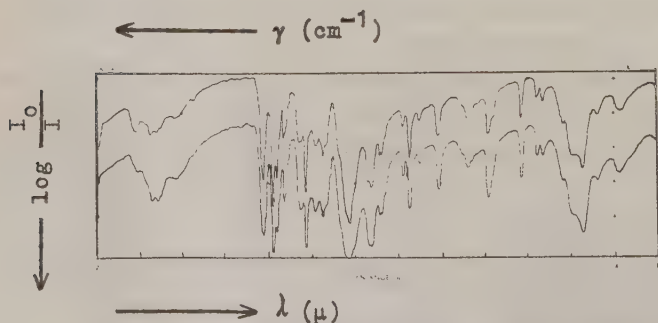


Abb. 6

Vergleich der IR-Spektren des Aglykons A und des Rheins

74) E.SCHRATZ u. H.J.VETHACKE, *Planta medica* 6, 44 (1958)

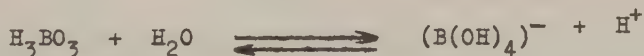
Identifizierung des Zuckers

Die mit Silberoxyd neutralisierte und über Kohle filtrierte Zuckerlösung wurde papierchromatographisch in den Systemen

1. Pyridin/Äthylazetat/Wasser 7:2:1
2. sek. Butanol/Eisessig/Wasser 5:3:2

mit verschiedenen authentischen Zuckern verglichen. Die R_F -Werte des nach der Hydrolyse aus dem Glykosid A erhaltenen Zuckers stimmten in beiden Systemen mit Glucose überein (System 1: R_F -Wert 0.36, System 2: R_F -Wert 0.42). Da wir aus Substanzmangel ein Zuckerosazon nicht herstellen konnten, zogen wir zum weiteren Beweis das elektrophoretische Verhalten hinzu.

Die Papierelektrophorese hat sich als wertvolles Hilfsmittel zur Trennung und Identifizierung von Kohlehydraten erwiesen, nachdem durch die Arbeiten von L. JÄENICKE⁷⁵⁾, H. MICHL⁷⁶⁾ und R. CONSDEN und W.M. STANIER⁷⁷⁾ die Bedeutung der Boratpuffer für die Trennung der Zucker erkannt worden war. In wässriger Boratlösung besteht folgendes Gleichgewicht:



Mit alkoholischen OH-Gruppen kann diese ionisierte Form eine Reihe von Komplexen bilden, deren Ausbildung bei den Kohlehydraten von der stereochemischen Anordnung der Hydroxylgruppen abhängig ist⁷⁸⁾⁷⁹⁾. Die Bildung des Komplexes erfolgt bei der Glucose sehr leicht; im elektrischen Feld wandert dieser zur Anode.

Die papierelektrophoretische Untersuchung unseres Zuckers (siehe Abb. 7) ergab auf dem Pherogramm die gleiche Laufstrecke wie Glucose (11.4 cm), beide Zucker waren in Richtung der Anode gewandert.

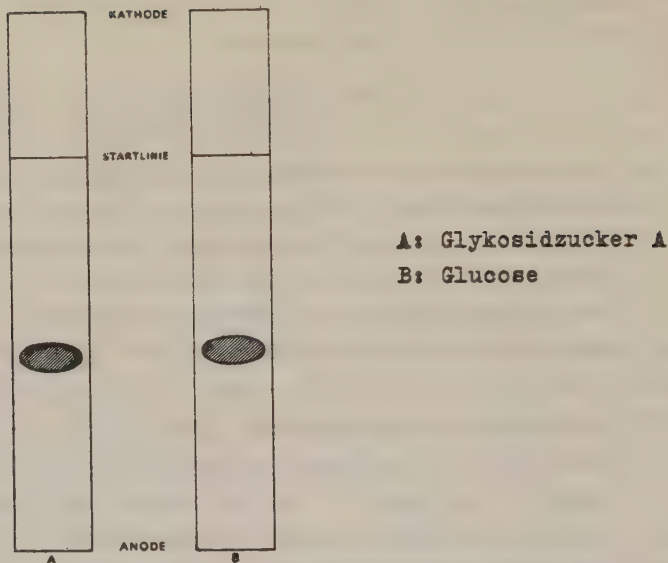
75) L. JÄENICKE, Naturwissenschaften, 39, 86 (1952)

76) H. MICHL, Mh. Chem., 83, 737 (1952)

77) R. CONSDEN u. W.M. STANIER, Nature (London), 169, 783 (1952)

78) J. BOESEKEN, Recueil Trav. chim. Pays-Bas, 61, 82 (1942)

79) J. BOESEKEN, Advances Carbohydrate Chem., 4, 189 (1949)



Vergleich der Pherogramme des Glykosidzuckers A mit Glucose in Boratpufferlösung. Besprüht mit ammoniakalischer Silbernitratlösung

Quantitative Aglykon- und Zuckerbestimmungen

Die nach Salzsäurehydrolyse ausgewogene Aglykonmenge ergab einen prozentualen Anteil von 56.2% im Glykosid. Der berechnete Wert für ein Rheinmonoglucosid beträgt 61.8%.

Zur weiteren Bestätigung ermittelten wir den Aglykongehalt durch spektrophotometrische Messungen, die auf der mit Alkalien hervorgerufenen BORNTRÄGER'schen Reaktion beruhen. In der Literatur sind zahlreiche nur wenig voneinander abweichende Verfahren beschrieben. Wir bedienen uns der von E. SCHRATZ und H.J. VETHACKE⁸⁰⁾ erarbeiteten Methode, die uns zur Ermittlung exakter Werte einzelner

80) E.SCHRATZ u. H.J.VETHACKE, Planta medica, 6, 44 (1958)

Anthrachinone vorteilhaft erschien. Den Nachteil der geringen Beständigkeit der natronalkalischen Anthrachinonlösung glichen wir dadurch aus, daß wir die Messung unmittelbar nach Ausschütteln mit Lauge durchführten. Vergleichsbestimmungen, die wir in Anlehnung an die sog. Eisessigmethode von H. AUTERHOFF⁸¹⁾ durchführten, lieferten keine besseren Werte. Den Gehalt ermittelten wir aus einer mit reinem authentischen Rhein aufgestellten Eichkurve. Bezogen auf die Menge des eingewogenen Glykosids ergaben sich bei mehreren durchgeführten Bestimmungen Werte zwischen 52.8% und 57.5% für den Anteil Aglykon im Glykosid, die ebenfalls auf den oben berechneten Wert (61.8%) zutreffen. Das Glykosid liegt also als M o n o g l y k o s i d vor. Die bei den Bestimmungen aufgetretene Fehlerbreite muß auf die für die kolorimetrischen Methoden zu geringen Einwaagen zurückgeführt werden, zu denen wir aus Substanzmangel gezwungen waren.

Die Bestimmung der Z u c k e r k o n z e n t r a t i o n erfolgte ebenfalls auf kolorimetrischem Wege nach Zusatz von Anthronreagenz. Wir bezogen uns dabei auf eine für Glucose aufgestellte Eichkurve. Der Zuckeranteil betrug 36.8% und 37.5% im Glykosid und steht in Übereinstimmung mit den für ein Rheinmonoglucosid berechneten Prozentwerten (38.3% Glucose im Glykosid).

Diskussion der ermittelten Werte für die Struktur des Glykosids A

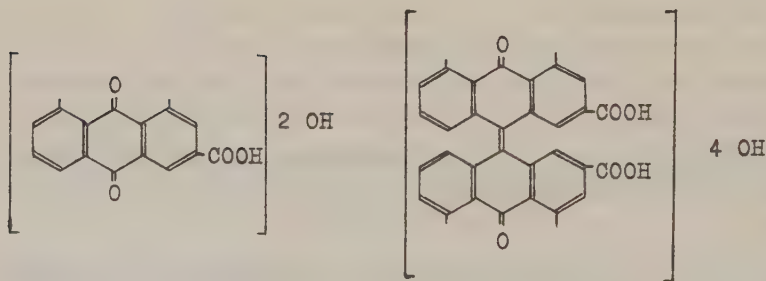
Die bei den quantitativen Bestimmungen erhaltenen Werte lassen erkennen, daß das Glykosid A etwa 40% Glucose und 60% Aglykonanteil enthält. Wie wir zeigen konnten, erwies sich das Aglykon als identisch mit dem in der Literatur beschriebenen Rhein. Legt man bei der Berechnung des prozentualen Aglykonanteils das KÖHLER'sche "Dirhein" (siehe Formelübersicht I) zugrunde, so ergibt sich für ein Rheinmonoglucosid 75.5%, für ein Rheindiglucosid 60.23% Aglykon im Glykosid. Bezieht man hingegen die Berechnung auf ein Rhein der Formel OESTERLE's, so sind die entsprechenden Werte bei einem Rheinmonoglucosid 61.66%,

1) H.AUTERHOFF, Dtsch.Apotheker-Ztg., 91, 415 (1951)

bei einem Rheindiglucosid 43.75%. Der quantitativen Zusammensetzung nach könnte es sich also um ein "Dirhein" mit zwei Zuckermolekülen oder um ein monomeres Rhein mit einer Molekel Glucose handeln.

Die bei der Analyse des isolierten Aglykons gefundenen CH-Werte wiesen erhebliche Differenzen zu den berechneten Werten auf, die sich bei der Zugrundelegung unserer dimeren Formel ergaben. Die Ergebnisse der Elementaranalyse trafen eher auf ein monomeres Rhein zu. Diese Beobachtungen veranlaßten uns, die Frage nach der endgültigen Formulierung des Rheins erneut aufzugreifen.

Formelübersicht I



Rhein
(nach O.A.OESTERLE)

"Dirhein"

Monoglycosid: Verglykosidierung an einer Hydroxylgruppe
Diglykosid: Verglykosidierung an zwei Hydroxylgruppen

2. Untersuchung über die Struktur des Rheins

Bei unseren Untersuchungen über die Identifizierung des Aglykons bezogen wir uns auf ein aus Rheum palmatum durch Hydrolyse und Ausschütteln mit Äther und Natriumbikarbonatlösung isoliertes Rhein, sowie auf ein nach der Vorschrift von R. ROBINSON und J.L. SIMONSEN⁸²⁾ aus Aloin durch Oxydation hergestelltes Rhein. Das ist eine von O.A. OESTERLE⁸³⁾ in seiner Konstitution ermittelte 1,8-Dihydroxyanthrachinon-3-carbonsäure. Mit diesem Formelbild ist aber eine kürzlich von H. WAGNER und I. KÖHLER⁸⁴⁾ gemachte Beobachtung, daß das Rhein nach einstündiger Salzsäurebehandlung in der Hitze weiter aufspaltbar erschien, nicht zu vereinbaren gewesen. Aus diesem Grunde forderten sie, dem bislang allgemein als monomer bekannten Rhein eine dimere Struktur zuzuordnen. Für die Klärung der Glykosidstruktur war eine Entscheidung über die monomere und dimere Formulierung erforderlich.

Ergebnisse der Arbeiten I. KÖHLER's⁸⁵⁾ über die dimere Formulierung des Rheins

I. HÖRHAMMER und Mitarbeiter⁸⁴⁾⁸⁶⁾⁸⁷⁾ hatten im wesentlichen mit Hilfe papierchromatographischer Vergleiche von Rheumextrakten untereinander sowie hieraus isolierten Substanzen mit Testsubstanzen in verschiedenen Systemen gearbeitet.

Sie beschrieben zunächst das unterschiedliche Verhalten eines Rheumextraktes beim Chromatographieren in Butanol/Wasser (Auftreten von drei Rheinglykosidflecken und einer "rheinartigen Verbindung") gegenüber Butanol/Eisessig/Wasser (Anwesenheit eines Rheinglykosidfleckens und eines Rheinaglykons). Diese Beobachtung deuteten sie dahingehend, daß eine ursprünglich dimere Verbindung durch die Säurenatur des Laufmittels eine Auf-

82) R.ROBINSON u. J.L.SIMONSEN, J.chem.Soc.(London), 95, 1085 (1909)

83) O.A.OESTERLE, Arch.Pharmaz., 250, 300 (1912)

84) H.WAGNER u. I.KÖHLER, Naturwissenschaften, 44, 260 (1957)

85) I.KÖHLER, Dissertation, München 1958

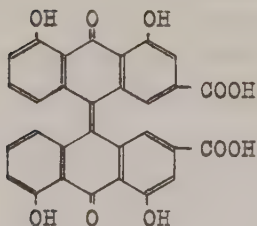
86) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u. I.KÖHLER, Naturwissenschaften, 45, 389 (1958)

87) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u. I.KÖHLER, Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharmaz.Ges., 292/64, 591 (1959)

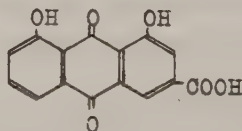
spaltung erfahren hatte, die in einem neutral reagierenden Lösungsmittel (Butanol/Wasser) nicht erfolgt. Zur Überprüfung dieser Annahme wurde ein methanolischer Rheumextrakt verschiedenen langen Hydrolysen mit Salzsäure unterworfen. Papierchromatographisch ließ sich in Butanol/Wasser mit zunehmender Hydrolysendauer ein deutliches Abnehmen des Rheinaglykons bei gleichzeitigem immer stärkerem Auftreten eines Fleckens mit "Rheincharakter" an der Lösungsmittelfront feststellen. Diese Tatsache schien ihre Annahme zu bestätigen.

Um das Verhalten eines dimeren Anthrakörpers zu studieren, unternahmen sie mit dem von A. STOLL⁸⁸⁾ isolierten und in seiner Struktur eindeutig als dimer erkannten Sennosid, bzw. dessen Aglykon, dem Sennidin, eine entsprechende Salzsäurebehandlung, wobei der oxydative Einfluß der Luft durch Arbeiten unter Stickstoffatmosphäre ausgeschaltet wurde. Entgegen den Angaben von A. STOLL, B. BECKER und A. HELFENSTEIN⁸⁹⁾, die das Sennidin nur oxydativ und reduktiv zu spalten vermochten, gelang nach ihren Versuchen eine Aufspaltung der Dihydrodianthronstruktur auch mit Salzsäure. Aus dieser Tatsache schlossen sie auf die mögliche Spaltbarkeit von Dehydrodianthronskeletten und forderten für das bislang bekannte Rhein der Formel OESTERLE's eine bimolekulare Struktur; dem "Spaltprodukt", das also monomer vorlag, gaben sie die alte OESTERLE'sche Formulierung (siehe Formelübersicht II).

Formelübersicht II



"Dirhein"



"Monorhein"

⁸⁸⁾ A. STOLL u. B. BECKER, Festschr. P. Casparis, Bern 1949, S. 221
⁸⁹⁾ A. STOLL, B. BECKER u. A. HELFENSTEIN, Helv. Chim. Acta, 33, 313 (1950)

Das bislang in der Literatur beschriebene Rhein sollte also in dimerer Form vorliegen und unter Säureeinwirkung in die monomere Anthrachinoncarbonsäure und dessen Anthron aufspalten. Als "Monorhein" wurde eine Substanz beschrieben, die in gelben bis orangefarbenen Nadeln kristallisiert und bei 175°C schmilzt. In weiteren Versuchen wurde festgestellt, daß sich analog der Zusammenlagerung von Rheinanthron zu Sennidin auch die oben erwähnten Spaltprodukte zum dimeren Rhein zusammenfügen ließen. Die papierchromatographischen, UV- und IR-spektrophotometrischen Ergebnisse, die zu diesen Schlüssen geführt hatten, wurden angeregt durch die Arbeiten von A. STOLL und B.BECKER⁹⁰⁾, die kurz vorher die Existenz einer dimeren Anthrachinoncarbonsäure in ihrer reduzierten Form, also der 1,8,1',8'-Tetrahydroxy-10,10'-dihydro-meso-dianthron-3,3'-dicarbonsäure, als in der Natur vorkommend, eindeutig gesichert hatten. Ein anderes natives dimeres Anthrachinonderivat ist das Hypericin, das sich formal und biogenetisch vom Rheum-Emodin ableitet, dessen endgültige Konstitution auf Grund der Arbeiten von H.BROCKMANN und Mitarbeitern⁹¹⁾ sichergestellt wurde. Das Vorhandensein einer Vorstufe als Dehydrodianthronderivat⁹²⁾ konnte von ihnen nachgewiesen werden. Es wäre daher das Vorkommen der oxydierten Stufe des Sennidins in der Natur nicht ausgeschlossen.

Zur Bestätigung der dimeren Struktur hatte bislang nur A. STOLL⁹⁰⁾ eine Molekulargewichtsbestimmung durchgeführt. Die monomeren Anthrachinone waren dagegen nur durch ihre chemischen Beziehungen untereinander in ihrer Konstitution aufgeklärt worden. Exakte Molekulargewichtsbestimmungen liegen hierfür noch nicht vor.

Molekulargewichtsbestimmung des Rheins

Die Frage nach der Formulierung des Rheins kann eindeutig nur durch Ermittlung des Molekulargewichtes beantwortet werden. Es hatten zwar schon A. TSCHIRCH und K. HEUBERGER⁹³⁾ durch Berechnungen aus den Elementaranalysen Aussagen über das Moleku-

90) A.STOLL u. B.BECKER, Festschr.P.Casparis, Bern 1949, S.221

91) H.BROCKMANN u. W.SANNE, Naturwissenschaften, 40, 509, (1953)

92) H.BROCKMANN, Fortschr.Chem.org.Naturstoffe, (Wien) 1957, S.142

93) A.TSCHIRCH u. K.HEUBERGER, Arch.Pharmaz., 240, 596 (1902)

largewicht gemacht und als Verhältnisformel $C_{15}H_8O_6$ festgelegt. O.A. OESTERLE⁹⁴⁾ hatte dann auf Grund seiner Arbeiten das Rhein als monomere Anthrachinoncarbonsäure ermittelt. Aussagen über eine eventuelle polymere Struktur lassen sich jedoch auf diese Weise nicht treffen.

1. Wir versuchten zunächst eine Molekulargewichtsbestimmung nach dem Verfahren der isothermen Destillation nach G. BARGER⁹⁵⁾ in der Modifikation nach R. SIGNER⁹⁶⁾ durchzuführen, das schon A. STOLL und B. BECKER⁹⁷⁾ zur Ermittlung des Molekulargewichtes der Sennoside und Sennidine angewandt hatten. Die chemische Analogie zwischen Sennidin und Rhein - bei Nachweis einer dimeren Struktur des Rheins würden sie sich nur in der Oxydationsstufe unterscheiden - ließ dieses Verfahren auch für unsere Zwecke als geeignet erscheinen. Wegen der Schwerlöslichkeit des Rheins in organischen Lösungsmitteln war eine Azetylierung der freien Hydroxylgruppen und eine Veresterung der Carboxylgruppe erforderlich. Es gelang jedoch nicht, auf diesem Wege eindeutige Werte zu erhalten.
2. Die Ermittlung des Molekulargewichtes gelang auf kryoskopischem Wege. Wir bedienten uns der Mikromethode nach K. RAST⁹⁸⁾, die auf der Messung der molaren Gefrierpunktserniedrigung beruht. Als Lösungsmittel verwandten wir Campher ($K = 36$), denn von den Derivaten des Rheins war Azetylrheinmethylester in Campher gut löslich. Der hierfür ermittelte Wert betrug 375. Ein Vergleich mit den entsprechenden Molekulargewichten für Tetraazetyldirheindimethylester (732) und Di-azetylrheinmethylester (382) ergab eindeutig, daß dem Rhein eine monomere Konstitution zukommt, womit die Formel O.A. OESTERLE's⁹⁴⁾ erneut bestätigt werden konnte.

94) O.A. OESTERLE, Arch. Pharmaz., 250, 300 (1912)

95) G. BARGER, Ber. dtsch. chem. Ges., 37, 1754 (1904)

96) R. SIGNER, Liebigs Ann. Chem., 478, 246 (1930)

97) A. STOLL u. B. BECKER, Festschr. P. Casparis, Bern 1949, S. 221

98) K. RAST, Ber. dtsch. chem. Ges., 55, 1051, 3727 (1922)

Untersuchungen über die Struktur des "Monorheins"

Es war nun von Interesse, festzustellen, in welcher Weise sich das Rhein bei der "Salzsäurespaltung" verändert hatte. Da hierbei in methanolischem Milieu gearbeitet worden war, muß grundsätzlich auch die Bildung eines Esters in Betracht gezogen werden, der sich unter der katalytischen Wirkung der Salzsäure leicht bilden kann.

Das Methanol war bei den "Spaltungsversuchen" zur besseren Löslichkeit des Rheins zugesetzt worden. Rhein ist jedoch auch in siedendem Wasser in Spuren löslich⁹⁹⁾. Die Spaltung eines dimeren Anthrachinons müßte daher auch im wässrigen Milieu möglich sein. Die Verwendung von Wasser als Lösungsmittel ließ unter allen Umständen die Möglichkeit einer Esterbildung ausscheiden. Wir versuchten daher eine "Aufspaltung" des Rheins entsprechend der Vorschrift von L. HÖRHAMMER, H. WAGNER und I. KÖHLER¹⁰⁰⁾, wobei wir lediglich das Methanol durch Wasser ersetzten. Auch nach mehrstündigem Kochen war papierchromatographisch keine Veränderung des Rheins festzustellen, was darauf hindeutet, daß zwischen der Säure und dem alkoholischen Lösungsmittel eine Esterbildung stattgefunden hat.

Auch ein Vergleich der R_F - Werte verschiedener Anthrachinone mit ihren funktionellen Gruppen deutet auf die Veresterung der hydrophilen Carboxylgruppe hin, da schon von H. BROCKMANN¹⁰¹⁾ die Beobachtung gemacht worden war, daß die Adsorption von den funktionellen Gruppen im Molekül abhängig ist. Dies konnte von E. SCHRATZ und H.J. VETHACKE¹⁰²⁾ für die Anthrachinone des Rhabarbers im System Petroläther/Toluol/Xylol/Methanol (4:1:1:1) bestätigt werden, wie aus der Tabelle 7 ersichtlich ist. Das Rhein hat also den niedrigsten R_F -Wert unter diesen vergleichbaren Anthrachinonen. Eine Veresterung der Carboxylgruppe würde erwarten lassen, daß die chromatographische Adsorption etwa der von Chrysophanol bzw. Physcion entspricht. Das ist in der Tat der Fall, denn der für "Monorhein" ermittelte R_F -Wert beträgt 0.95.

99) O.A.OESTERLE, Arch.Pharmaz., 241, 604 (1903)

100) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u. I.KÖHLER, Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharmaz.Ges., 292/64, 591 (1959)

101) H.BROCKMANN, Angew.Chem., 59, 199 (1947)

102) E.SCHRATZ u. H.J.VETHACKE, Planta medica, 6, 44 (1958)

T a b e l l e 7

Vergleich der R_f -Werte mit den funktionellen Gruppen von 1,8-Dihydroxyanthrachinonen in C_3 - bzw. C_6 -Stellung

Substanz	R_f -Wert	funktionelle Gruppen
Chrysophanol	0.96	CH_3
Physcion	0.93	$OCH_3 + CH_3$
Rheum-Emodin	0.49	$OH + CH_3$
Aloe-Emodin	0.27	CH_2OH
Rhein	0.04	$COOH$

Infrarotspektrophotometrie

Die Hypothese von der bimolekularen Struktur des Rheins stützte sich damals auf die erheblichen Unterschiede zwischen den IR-Spektren des "Monorheins" und "Dirheins" im Bereich von 1600 cm^{-1} bis 1800 cm^{-1} . Das Spektrum des "Dirheins" (Abb. 8) weist neben der Carbonylschwingung der $COOH$ -Gruppe (1705 cm^{-1}) nur noch eine weitere Bande bei 1630 cm^{-1} auf, die den chelierten $C=O$ -Gruppen des chinoiden Systems zugeordnet werden. Diese Schwingung des "Spaltproduktes" (Abb. 9) entspricht ebenfalls dem chelierten Carbonyl. Neben der natürlich auch hier auftretenden Carbonylbande der $COOH$ -Gruppe, die gegenüber der des "Dirheins" ein wenig verschoben ist (1735 cm^{-1}), tritt hier eine weitere Bande bei 1680 cm^{-1} auf. Sie soll nach den Angaben L. HÖRHAMMER's von der freien, nicht chelierten Carbonylbindung verursacht werden. In diesem Bereich befindet sich nach L.J. BELLAMY¹⁰³⁾ jedoch auch die Esterbande, die je nach Molekülbau verschieden stark nach längeren Wellen hin verschoben sein kann. Demzufolge ist wohl die beim "Monorhein" neu auftretende Bande (1680 cm^{-1}) von der Estercarbonylschwingung verursacht worden. Ein nach der Vorschrift von R. ROBINSON und J.L. SIMONSEN¹⁰⁴⁾ hergestellter Rheinmethylester zeigte in seinem IR-Spektrum völlige Übereinstimmung mit dem Spektrum des "Monorheins"^{105)*}. (siehe Abb. 10).

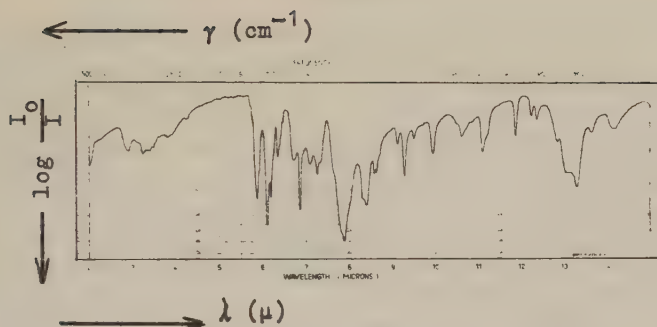
¹⁰³⁾ L.J.BELLAMY, Ultrarotspektrum u.chemische Konstitution, Darmstadt, 1955, S. 142

¹⁰⁴⁾ R.ROBINSON u. J.L.SIMONSEN, J.chem.Soc.(London), 95, 1085 (1909)

¹⁰⁵⁾ H.AUTERHOFF u.F.C.SCHERFF, Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharmaz.Ges., 293/65, 918 (1960)

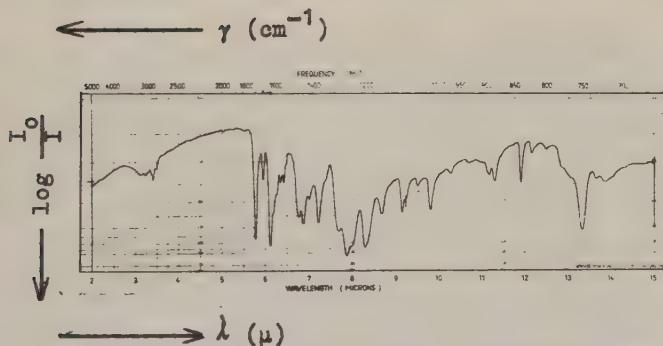
*)Nach einer privaten Mitteilung von Prof.Dr.H.Auterhoff, Braunschweig

Abb. 8



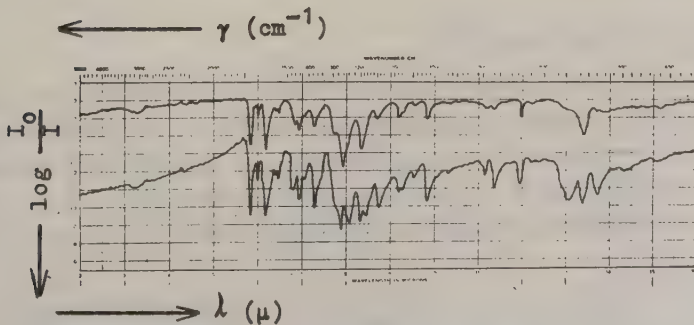
IR-Spektrum des "Dirheins"

Abb. 9



IR-Spektrum des "Monorheins"

Abb. 10



Vergleich der IR-Spektren des "Monorheins" und des Rheinmethylesters

Elementaranalysen

Die bei der Elementaranalyse des "Dirheins" und "Monorheins" gefundenen CH-Werte lagen im Mittel 7 - 9% unter den für diese Substanzen berechneten Werten. Obwohl die Substanzen durch Sublimation gereinigt worden waren, ist bei den Verbrennungsanalysen stets ein Rückstand verblieben. Diese ungenauen Werte deuten darauf hin, daß noch nicht vollständig reine Produkte vorlagen. Wir unterzogen daher das Rhein einer wiederholten Kristallisation aus Eisessig, Methanol und Äther und bestimmten erneut die CH-Werte. Die ohne Rückstand erfolgte Verbrennung ergab mit Werten von 63.06% Kohlenstoff und 1.98% Wasserstoff eine Übereinstimmung mit den berechneten Werten für ein Rhein monomerer Struktur (63.38% C, 2.82% H), worin auch hier eine Bestätigung der Formulierung O.A. OESTERLE's für das Rhein liegt.

Das "Monorhein" wurde als Methylester des Rheins erkannt. Das nach der Vorschrift von L. HÖRHAMMER, H. WAGNER und I. KÖHLER¹⁰⁶⁾ hergestellte "Spaltprodukt" konnten wir durch Chromatographie sehr gut von seinen begleitenden Verunreinigungen trennen, und es wurde anschließend durch Sublimation gereinigt. Die ermittelten Werte für Kohlenstoff (62.98%), Wasserstoff (3.65%) und dem prozentualen Anteil an OCH_3 -Gruppen (9.26%) liegen nur wenig unter den für Rheinmethylester berechneten (64.42% C, 3.35% H, 10.02% OCH_3) und sind ein weiterer Beweis für die Annahme, daß bei den "Spaltungsversuchen" eine Esterbildung stattgefunden hat. Auch hier war bei der Analyse kein Rückstand verblieben.

Diskussion der Ergebnisse *)

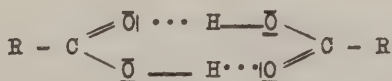
Bei unseren Untersuchungen war analytisch lediglich ein Rhein monomerer Struktur nachzuweisen gewesen. Die Behandlung des Rheins mit methanolischer Salzsäure in der Wärme verursacht daher die Bildung des Methylesters, dessen Schmelzpunkt (174°C) mit dem des "Monorheins" (175°C) übereinstimmt. Auch der als

106) L. HÖRHAMMER, H. WAGNER u. I. KÖHLER, Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges., 292/64, 591 (1959)

*) Wir danken Herrn Professor Dr. H. Auerhoff, Direktor des Instituts für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Technischen Hochschule Braunschweig, für wertvolle Anregungen.

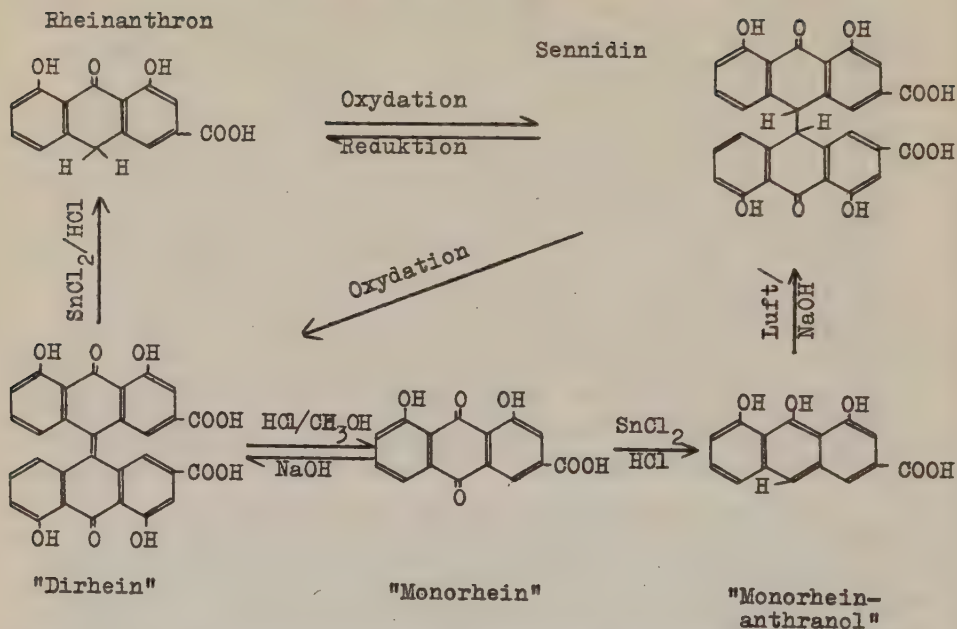
"Dimerisierung von Monorhein und Monorheinanthranol" beschriebene Vorgang läßt sich sehr gut mit der Verseifung eines Rheinmethylesters in Einklang bringen. Die Aufspaltung des Sennidins erfolgt also nicht erst nach vorheriger Oxydation zum "Dirhein", sondern direkt zum monomeren Rhein. (Siehe Formelübersicht III). Die durch Reduktion mit Zinnchlorür/Salzsäure aus "Monorhein" bzw. Rheinmethylester erhaltene Substanz vom Schmelzpunkt 169°C stellt wohl den Methylester des Rheinanthrone dar, den A. STOLL, B. BECKER und A. HELFENSTEIN¹⁰⁷⁾ mit einem Schmelzpunkt von $188 - 191^{\circ}\text{C}$ beschrieben haben. Der Übergang des Rheinanthrone methylesters zum Sennidin mit Luft-sauerstoff in Natronlauge ließe sich als Oxydation unter gleichzeitiger Verseifung des Esters erklären. Für die Bildung eines Esters bzw. dessen Verseifung anstelle der Spaltung bzw. Dimerisierung spricht auch der allmähliche Verlauf der Reaktionen.

Auf Grund seiner Eigenschaften nimmt Rhein jedoch eine Sonderstellung unter den Anthrachinonen des Rhabarbers ein. Die Schwierigkeiten, analytisch reines Rhein zu gewinnen, sowie die schlechten Kristallisationseigenschaften lassen die Möglichkeit offen, daß das Rhein in Form chemisch nicht nachweisbarer Assoziate vorliegt. Als Angriffspunkt kommt die Carboxylgruppe in Betracht, denn durch Veresterung derselben wird der gegenüber anderen Anthrachinonen sehr hohe Schmelzpunkt des Rheins (321°C) stark herabgedrückt (Rheinmethylester: 175°C). Eine zusätzliche Bindung der Moleküle über Wasserstoffbrücken der Carboxylgruppen erscheint daher nicht ausgeschlossen:

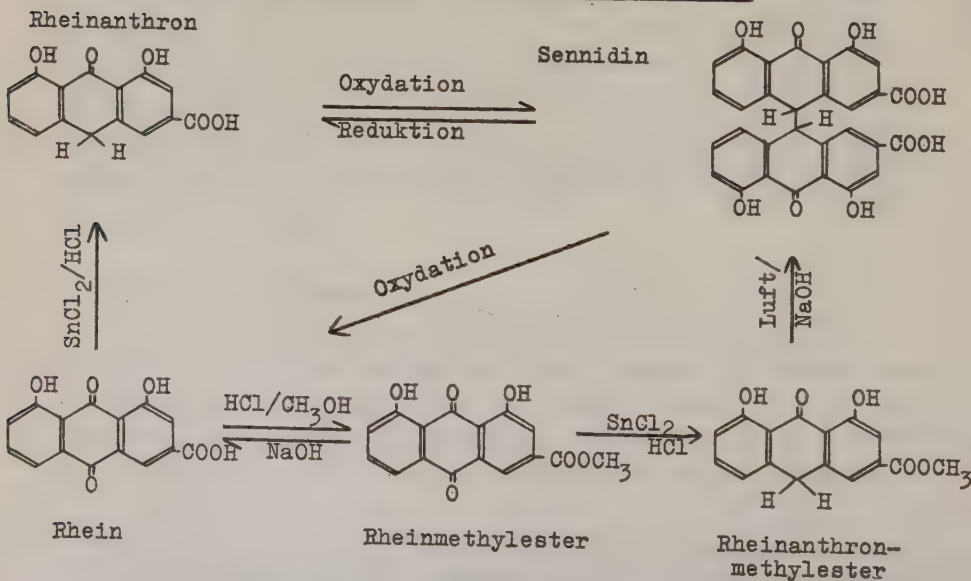


107) A. STOLL, B. BECKER u. A. HELFENSTEIN, *Helv. chim. Acta*, **33**, 313 (1950)

Formelübersicht III



nach L. HÖRHAMMER, H. WAGNER und I. KÖHLER



Bildung eines Methylesters

3. Stellung der Glucose im Rheinglykosid

Bei den bislang erfolgten Isolierungsarbeiten von 1,8-Dihydroxyanthrachinonglykosiden haben lediglich A. STOLL und Mitarbeiter¹⁰⁸⁾ eine totale Aufklärung ihrer Sennoside durchgeführt. Auf Grund ihrer eingehenden Arbeiten konnten sie die Konstitution des Sennosids als eines 8,8'-Diglucosidodirheinanthrons ermitteln, dessen Zusammensetzung sie später durch eine Partialsynthese bestätigen konnten. Ein von O.E. SCHULTZ und G. MAYER¹⁰⁹⁾ aus Rheum undulatum isoliertes Anthrachinonglykosid wurde von ihnen als Rheum-Emodin-Monoglucosid erkannt. Aussagen über die Zuckerstellung wurden nicht gemacht.

Bei unseren Untersuchungen über die Verknüpfungsstelle der Glucose am Rhein konnten wir uns auf die Arbeiten A.C. BELLAART's^{110)*)} beziehen, dem die Synthese eines Rhein-l-Glucosids gelungen war. Dieser hatte sich bei der Konstitutionsermittlung auf die Ergebnisse von A. STOLL und B. BECKER¹¹¹⁾ stützen und sein synthetisiertes Rheinmonoglucosid nach Methylierung und Abspaltung des Zuckers mit der von A. STOLL beschriebenen 8-Hydroxy-1-methoxyanthrachinon-3-carbonsäure vergleichen können. Allerdings war die bei der Isolierung gewonnene Glykosidmenge zu gering, um Derivate unseres Rheinglykosids zum Vergleich mit schon bekannten Azetyl- und Methylprodukten des synthetisierten Rhein-l-glucosids herzustellen. Eine Beurteilung war aber mit Hilfe von Schmelzpunkt, Papierchromatographie und Infrarotspektren möglich.

Bei der Charakterisierung unseres isolierten Glykosids war ein Schmelzen der Substanz nicht zu beobachten. Als Z e r s e t z u n g s p u n k t ermittelten wir ein Temperaturintervall von 266 - 270°C. Auch A.C. BELLAART¹¹²⁾ gibt für sein synthetisch hergestelltes Rhein-l-glucosid keinen scharfen Schmelzpunkt an. Der von ihm beobachtete Zersetzungspunkt liegt bei etwa 170°C.

108) A. STOLL u. B. BECKER, Fortschr. Chem. org. Naturstoffe (Wien) 1950, S. 248

109) O.E. SCHULTZ u. G. MAYER, Arzneimittelforsch., 6, 334 (1956)

110) A.C. BELLAART u. C. KONINGSBERGER, Recueil Trav. chim. Pays-Bas, 79, 285 (1960)

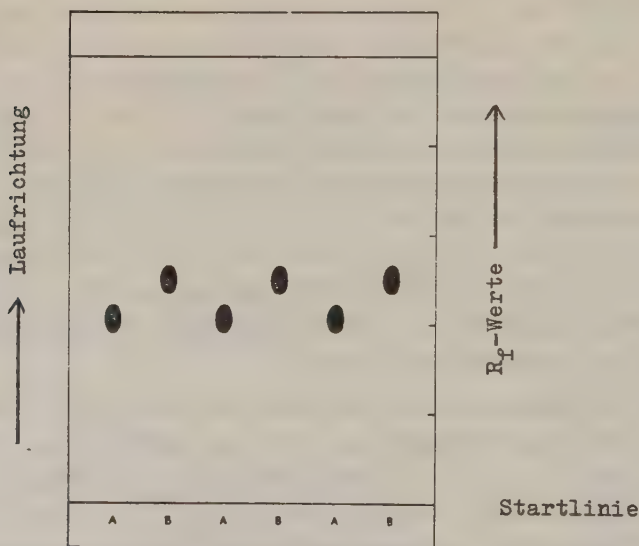
111) A. STOLL u. B. BECKER, Recueil Trav. chim. Pays-Bas, 69, 553 (1950)

112) A.C. BELLAART, Pharmac. Weekbl., 87, 33 (1952)

*) Wir danken Herrn Dr. A.C. Bellaart, Groningen, für Überlassung einer Probe seines Rhein-l-glucosids.

Bei der papierchromatographischen Untersuchung wurden die methanolischen Lösungen der Glykoside punktförmig abwechselnd nebeneinander aufgetragen, um so auch nur geringfügige Abweichungen in den R_F -Werten deutlich feststellen zu können. Nach der Entwicklung in n-Propanol/Äthylazetat/Wasser wiesen die Flecke deutliche Unterschiede in den R_F -Werten auf, wie sich aus Abbildung 11 erkennen läßt. Auf Grund des papierchromatographischen Vergleiches ist erwiesen, daß die beiden Substanzen nicht identisch sind. Da es sich jedoch in beiden Fällen jeweils um ein Monoglucosid des Rheins handelt, ist ein Unterschied lediglich in der Zuckerstellung möglich.

Abb. 11



Papierchromatographischer Vergleich des Glykosids A mit Rhein-1-glucosid in n-Propanol/Äthylazetat/Wasser 4:3:3, aufsteigend, besprüht mit 1%iger methanolischer Magnesiumlösung

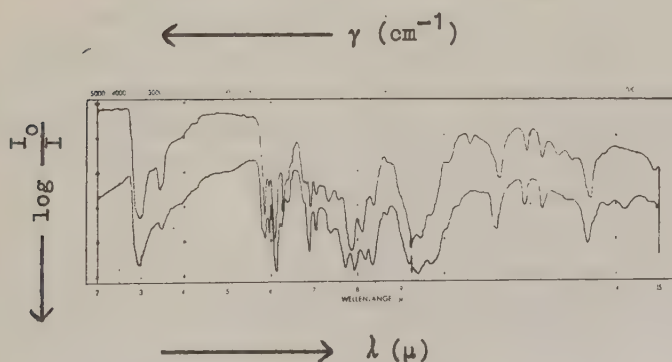
A = Glykosid A

B = Rhein-1-glucosid

Der Verlauf der UV - A b s o r p t i o n s s p e k -
t r e n in Methanol und in n/100 methanol. Kalilauge ließ
keinen Unterschied in Zahl und Lage der Maxima erkennen. Eine
Differenzierung tritt lediglich bei der quantitativen Auswer-
tung der Spektren auf, denn der für Rhein-l-glucosid berechne-
te spezielle Extinktionskoeffizient für 410 m μ weist mit 16.9
einen höheren Wert auf als der des Glykosids A bei der gleichen
Wellenlänge (12.3). Die durch die Verknüpfung des Zuckers in
1 bzw. 8-Stellung verursachten Unterschiede in den Spektren
prägen sich offensichtlich nur durch verschiedene Absorptions-
intensität bei den gleichen Wellenlängen aus.

Der Vergleich der I n f r a r o t s p e k t r e n der
beiden Glykoside läßt Unterschiede in Zahl und Lage der Ban-
den im Bereich zwischen 1190 und 1300 cm^{-1} sowie bei 1700 cm^{-1}
erkennen, wie aus Abb. 12 ersichtlich ist. Vor allem die Dif-
ferenzen bei 1250 cm^{-1} lassen auf eine unterschiedliche Zucker-
verknüpfung schließen. Somit dürfte es sich bei dem von uns
isolierten Rheinglucosid um das R h e i n - 8 - g l u c o -
s i d handeln.

Abb. 12



Vergleich der IR-Spektren des Glykosids A und des Rhein-l-
glucosids

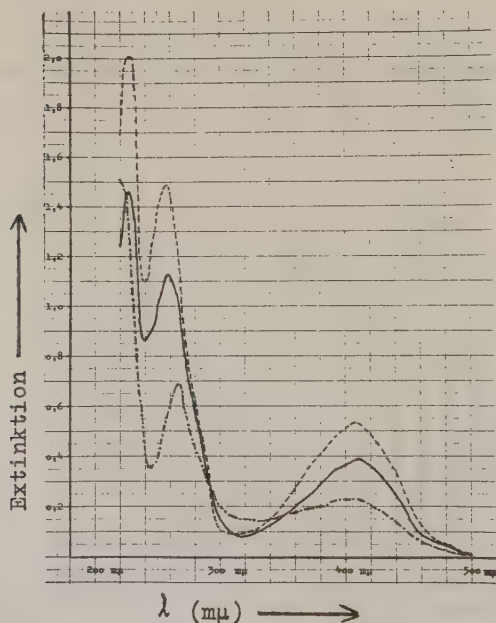
4. Versuche zur Identifizierung des Glykosids B

Nachweis der glykosidischen Struktur

Bei der Gewinnung des Glykosids B hatten wir mehrfach feststellen können, daß es bei Anwendung von Wärme oder längerem Stehen in methanolischer Lösung aufgespalten wurde. Ein Vergleich des Spaltproduktes mit dem papierchromatographischen Bild eines Rheumextraktes zeigte, daß sich daraus Glykosid A gebildet hatte. Aus dieser Beobachtung konnten wir auf die Glykosidnatur schließen.

Auch der Vergleich der UV - S p e k t r e n in Methanol ließ erkennen, daß es sich um ein Glykosid handeln mußte. Die Kurve entspricht in ihrem Verlauf und der Bandenlage der des Glykosids A (siehe Abb. 13).

Abb. 13



Vergleich der UV-Absorptionsspektren von Glykosid A und Rhein-l-glucosid mit Glykosid B in Methanol. Aufgenommen mit dem Zeiss Opton-Spektralphotometer M Q 4.

———— Glykosid A
 ----- Rhein-l-glucosid
 -.-.-.-.- Glykosid B

Papierchromatographische Identifizierung

Nach einer halbstündigen Hydrolyse mit 2.5%iger Salzsäure war das Glykosid vollständig gespalten. Durch papierchromatographischen Vergleich mit verschiedenen Anthrachinonen und authentischen Zuckern in den entsprechenden Systemen ließen sich als Aglykonanteil R h e i n und als Zuckeranteil G l u c o - s e feststellen.

Untersuchungen über die Struktur des Glykosids B

Da das Glykosid B nicht in kristalliner Form vorlag, versuchten wir aus der Lösung auf spektrophotometrischem Wege die prozentuale Zusammensetzung zu ermitteln. Dieses Verfahren war jedoch in unserem Fall nicht anwendbar, da sich herausstellte, daß die erhaltenen Werte für die Glucose (Anthronmethode) wesentlich zu hoch lagen; der ermittelte Rheinanteil entsprach den Erwartungen. Das erscheint durchaus verständlich, da die in den Chromatogrammen deutlich sichtbare Überlagerung mit den Gerbstoffen eine Trennung des Glykosids hiervon nicht möglich macht. Nach verschiedenen Autoren¹¹³⁾¹¹⁴⁾ bestehen die Gerbstoffe u.a. aus Glucogallin und Tetrarin, die bei einer Hydrolyse Zucker abspalten.

Die Beobachtung, daß durch Aufspaltung des Glykosids B als Zersetzungsprodukt ein Rheinmonoglucosid entsteht, läßt vermuten, daß das Glykosid B ein R h e i n d i g l u c o s i d ist. Dafür spricht auch der im System n-Propanol/Äthylazetat/Wasser festgestellte niedere R_F -Wert, der auf dessen stärker ausgeprägten hydrophilen Eigenschaften beruht.

¹¹³⁾ C.WEHRMER, Die Pflanzenstoffe, Jena, I. 1929, S. 267
¹¹⁴⁾ E.N.GATHERCOAL u. E.H.WIRTH, Pharmacognosy, by E.P.CLAUS, Philadelphia, 1956, S. 135

C. Über Polymerprodukte des Rheins

Die Schwierigkeiten, exakt reproduzierbare Methoden für die quantitative Bestimmung der Anthraderivate zu entwickeln, beruhen auf der geringen Stabilität der Anthrachinone in alkalischen Lösungen sowie auf der Uneinheitlichkeit der bei der Oxydation ihrer reduzierten Formen entstehenden Produkte. So haben W. KUSSMAUL und B. BECKER¹¹⁵⁾ bei ihren Arbeiten über eine kolorimetrische Bestimmungsmethode der Sennoside bei den Versuchen, ein geeignetes Medium zur Oxydation ihres Sennidins zum Rhein zu finden, anstelle der normalerweise bei BORNTÄGER-Reaktionen hervorgerufenen kirschroten Färbung violettstichige Lösungen beobachtet. Nach ihren eigenen Angaben läßt schon ein einfacher visueller Vergleich der alkalischen Lösungen erkennen, daß in der bei der Oxydation mit H_2O_2 aus Sennidin erhaltenen Lösung nicht nur Rhein entstanden ist. Die gleichen Beobachtungen konnte H. AUTERHOFF¹¹⁶⁾ bei der Oxydation der Anthrone und Anthranole des Rhabarbers mit Wasserstoffperoxyd - wie von R. FISCHER und E. BUCHEGGER¹¹⁷⁾ vorgeschlagen wurde - machen, da "..... die Lösungen dabei einen anderen, mehr violetten Farbton annehmen. Bei der Wasserstoffperoxydation bilden sich offensichtlich neben den Anthrachinonen größere Mengen höhermolekularer Anthrachinonderivate"

Bei unseren Untersuchungen über Rhein konnten auch wir die Beobachtung machen, daß bei der Oxydation reduzierter Anthrachinone nur schwer zu einheitlichen Endprodukten zu gelangen war. Um einen Einblick in die Art der hierbei entstandenen Stoffe zu erhalten, untersuchten wir papierchromatographisch die bei der Peroxydoxidation von Sennidin^{*)} entstandenen alkalischen Lösungen. Dabei konnten wir feststellen, daß zwar ein Teil in Rhein übergegangen war, aber auch Nebenprodukte entstanden waren, die sich auf dem papierchromatographischen Bild vom Startpunkt zur Höhe des Rheins hinzogen, wie dies in Abb. 14 gezeigt wird. Wir kamen damit zum

115) W.KUSSMAUL u. B.BECKER, Helv.chim.Acta, 30, 59 (1947)

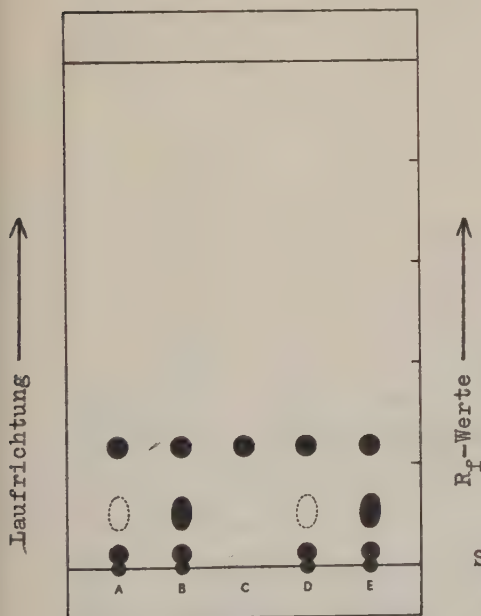
116) H.AUTERHOFF, Dtsch. Apotheker-Ztg., 91, 415 (1951)

117) R.FISCHER u. E.BUCHEGGER, Pharmaz.Zentralhalle, Deutschland, 89, 261 (1950)

*) Wir danken Herrn Dr.J. Renz, Direktor der Fa. Sandoz, Basel, für die Überlassung von Sennosiden.

gleichen Ergebnis wie A. STOLL, B. BECKER und A. HELFENSTEIN¹¹⁸⁾ bei ihren Arbeiten über die Konstitution der Sennoside: "Versuche, die qualitativ leicht durchführbare Oxydation zur Anthrachinonstufe quantitativ zu gestalten, führten nicht zu reproduzierbaren Resultaten...". Dabei traten im Gegensatz zu der von H. AUTERHOFF¹¹⁹⁾ gewählten HCl/Eisessig-Hydrolyse bei der reinen HCl-Hydrolyse die Nebenprodukte viel stärker auf. Offensichtlich wirkt im ersteren Fall der Einfluß des Eisessigs stabilisierend. Es erscheint daher berechtigt, zur Hydrolyse die reine Mineralsäure durch ein Eisessig/HCl-Gemisch zu ersetzen.

Abb. 14



Papierchromatographisches Bild einer alkalischen Sennidinlösung nach Oxydation mit Wasserstoffperoxyd.
 Laufmittel: Petroläther/Toluol/Xylol/Methanol 4:1:1:2, aufsteigend, besprüht mit 5%iger methan. KOH.

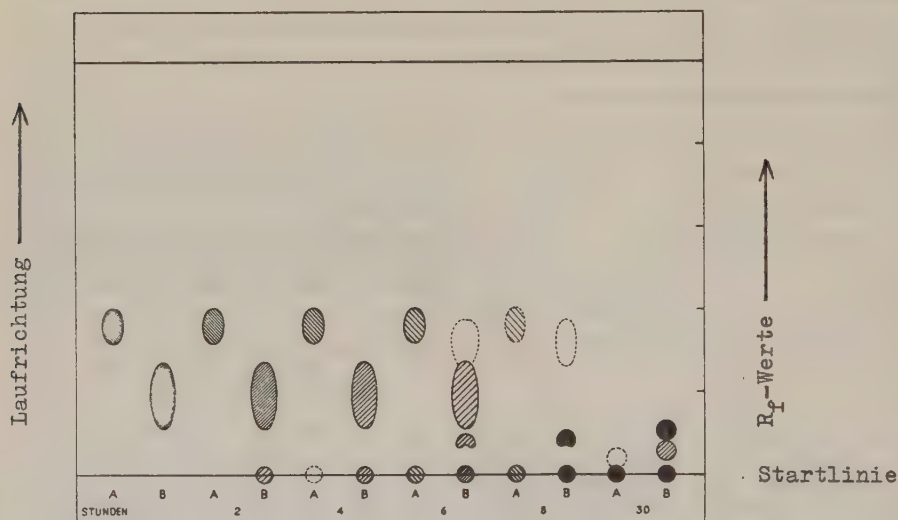
- A = Oxydationszeit 15 Minuten (hydrolysiert aus Sennosid m.HCl/Eis.)
 B = Oxydationszeit 15 Minuten (hydrolysiert aus Sennosid m.HCl)
 C = Rhein
 D = Oxydationszeit 4 Minuten (hydrolysiert aus Sennosid m.HCl/Eis.)
 E = Oxydationszeit 4 Minuten (hydrolysiert aus Sennosid m.HCl)

118) A.STOLL, B.BECKER u. A.HELFFENSTEIN, *Helv.chim.Acta*, 33, 313 (1950)

119) H.AUTERHOFF, *Arzneimittelforsch.*, 1, 412 (1951)

Auch die vergleichende Luftoxydation von Sennidin und Rhein in alkalischer Lösung über mehrere Tage zeigte eine stetige Abnahme der ursprünglichen Flecken und eine Zunahme mehrerer Oxydationsprodukte am Startpunkt und in dessen unmittelbarer Nähe (siehe Abbildung 15). Daraus ergibt sich, daß bei der Oxydation der Anthrone sowohl mit Peroxyd als auch mit Luft nicht zu dem gewünschten einheitlichen Endprodukt (Rhein) zu gelangen ist.

Abb. 15



Papierchromatographisches Bild der Veränderung einer alkalischen Rhein- bzw. Sennidinlösung bei Einwirkung von Luftsauerstoff

Laufmittel: Butanol/Wasser (gesättigt)

aufsteigend, besprüht mit 5%iger methan. KOH

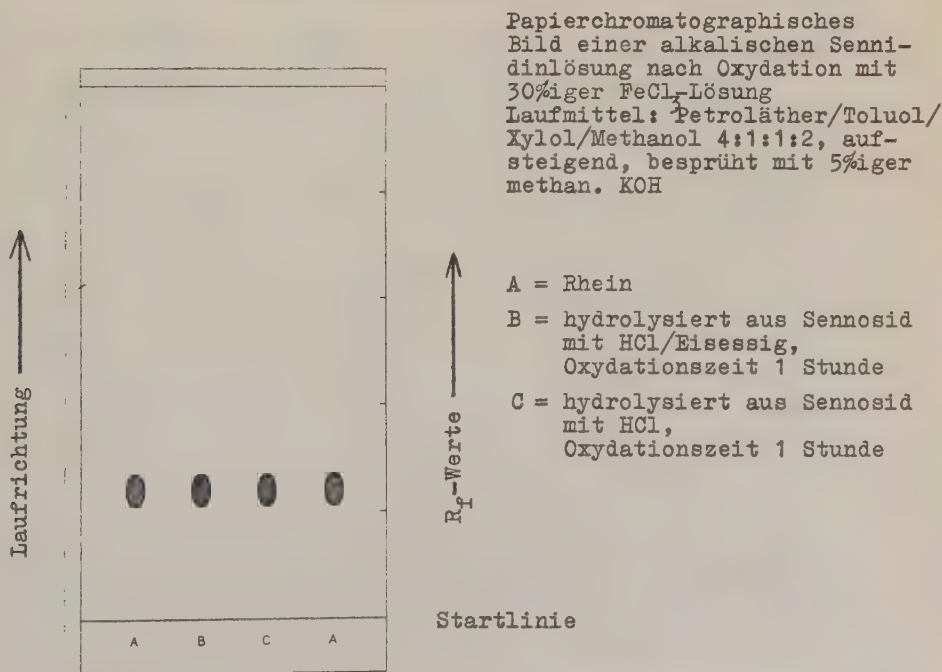
A = Rhein

B = Sennidin

Ein ebenfalls zur Oxydation von Anthraderivaten verwandtes Mittel ist Eisen-III-chlorid, das von H. AUTERHOFF und B. BALL¹²⁰⁾ zur kolorimetrischen Bestimmung der Aloe herangezogen wurde. Bei Verwendung einer FeCl_3 -Lösung anstelle von Wasserstoffperoxyd zur Oxydation der Sennidine konnten wir auf dem Papierchromatogramm nur Rhein als Reaktionsprodukt feststellen, wie aus Abb. 16 hervorgeht.

Für eine Überprüfung der kolorimetrischen Bestimmungsmethode der Sennoside wäre daher zu empfehlen, die Oxydation statt mit H_2O_2 mit Eisen-III-chlorid durchzuführen.

Abb. 16



¹²⁰⁾ H.AUTERHOFF u. B.BALL, Arzneimittelforsch., 4, 725 (1954)

Die bei der Oxydation entstehenden Nebenprodukte sind in ihrer Struktur noch nicht bekannt. Es wird angenommen, daß es sich um Polymerprodukte reduzierter Anthrachinone handelt, wie auch schon H. AUTERHOFF vermutete (siehe S. 42). So beschreibt O. HESSE¹²¹⁾ ein schwarzes glänzendes Pulver, das er durch Luft-einleiten in eine alkalische Chrysophansäureanthronlösung erhalten hat: "Das Chrysarobin wird beim Erhitzen mit Eisessig all-mählich in amorphe Substanzen verwandelt, die beim Eingießen der Lösung in kaltes Wasser in Flocken ausfallen, welche bei kürze-rem Erhitzen gelb, bei längerem Erhitzen dunkelfarbig erscheinen. Dabei wurde das Chrysarobin polymerisiert und zwar so, daß anfäng-lich zweifellos Dichrysarobin entstand." Da die bei den Oxyda-tionsreaktionen erhaltenen Stoffe des Sennidins und des Rheins auf dem Papierchromatogramm ähnliches Verhalten zeigten, liegt die Vermutung nahe, daß die Oxydation des Sennidins über die Stu-fe des Rheins hinaus zu Polymerprodukten führt.

1. Untersuchung eines aus Rhein erhaltenen Belichtungsproduktes

Aus diesem Grunde war eine papierchromatographische Un-tersuchung von Rheinpolymerisaten interessant, die schon frü-her von uns¹²²⁾ auf anderem Wege erhalten worden waren. Durch Lichteinwirkung hatte sich nämlich eine Rheinlösung in Pyridin in charakteristischer Weise verändert. Diese äußerte sich schon visuell durch eine Verfärbung der zunächst gelben Lösung nach tiefviolett. Dabei wurden verschiedene Zwischenfarben durchlaufen, bis nach ca. 24 Stunden eine weitere Veränderung nicht mehr erfolgte. Die spektrophotometrische Untersuchung dieser Erscheinung ergab eine starke bathochrome Verschiebung des in der ursprünglichen Lösung dominierenden Maximums bei 435 m μ . Außerdem ist ein schwach ausgebildetes bei 300 m μ zu finden. Bei Stehenlassen dieser Lösung im Tageslicht oder UV-Licht bildete sich ein im Verlaufe mehrerer Stunden immer stär-ker werdendes Maximum bei 550 m μ aus, während das Maximum bei 435 m μ im gleichen Maße abnahm und zu einem Minimum wurde. Das schwache Maximum bei 300 m μ wurde ebenfalls ständig erhöht.

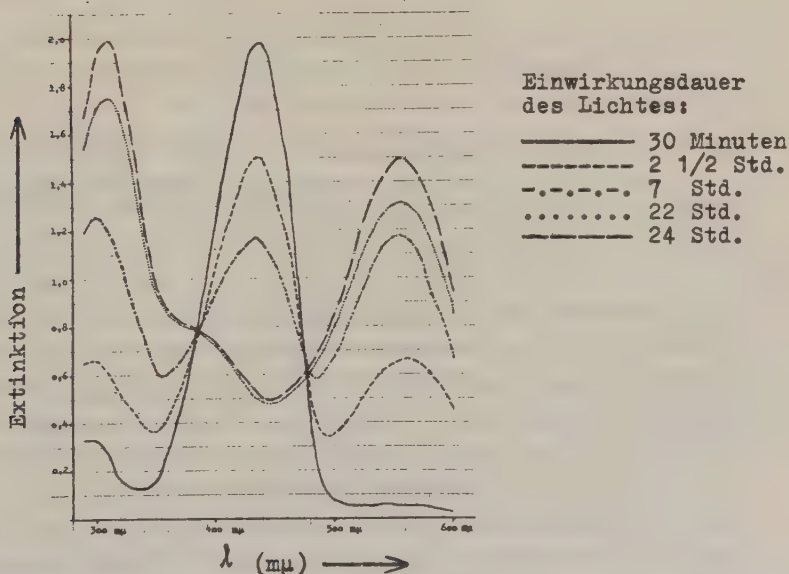
121) O. HESSE, Liebigs Ann. Chem., 309, 32 (1899)

122) I. KÖHLER, Dissertation, München 1958

Nach etwa 24 Stunden war die Reaktion beendet, der Verlauf der Kurve veränderte sich durch weitere Belichtung nicht mehr und ein ⁱⁿPyridin schwerlösliches Produkt schied sich als schwarz-violettes amorphes Pulver ab (siehe Abb. 17).

Wie aus Abbildung 17 ersichtlich ist, verlaufen alle Kurven durch zwei Schnittpunkte, die als "Isobestische Punkte" bezeichnet werden. Das Auftreten isobestischer Punkte deutet auf das Entstehen von Gleichgewichten bei Dissoziations- oder Assoziationserscheinungen oder die Bildung einer stöchiometrischen Molekülverbindung hin¹²³⁾. Eine Bildung von Polymeren des Rheins könnte also für diese Erscheinung verantwortlich sein und würde die Vermutungen verschiedener Autoren bestätigen.

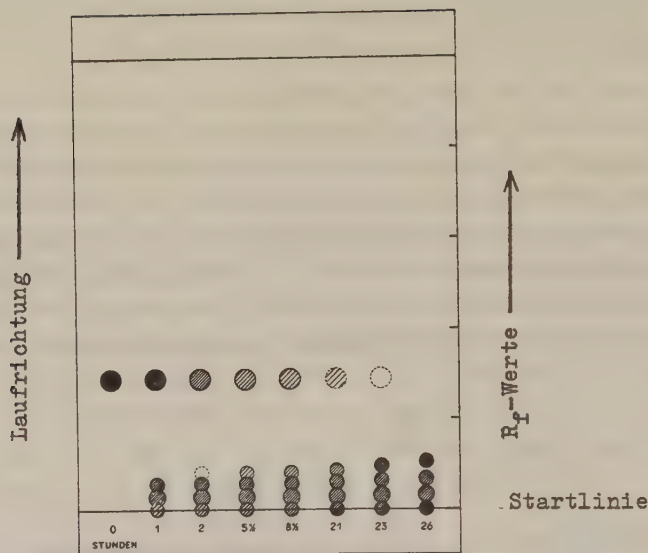
Abb. 17



UV-Absorptionsspektren der Veränderung einer Rheinlösung (Pyridin) durch ständige Lichteinwirkung, gemessen im Zeiss Opton-Spektralphotometer M Q 4

¹²³⁾ G. KORTÜM, Kolorimetrie, Photometrie und Spektrophotometrie (Berlin-Göttingen-Heidelberg) 1955, S. 34

Abb. 18



Papierchromatographisches Bild der Veränderung einer Rheinlösung (Pyridin) durch ständige Lichteinwirkung.

Laufmittel: Butanol/Wasser (gesättigt)
aufsteigend, unbesprüht

Im papierchromatographischen Bild war bei der Verfolgung dieser Belichtungsreaktion schon nach einer Stunde eine Abnahme der Intensität des Rheinfleckes festzustellen. Dafür war am Startpunkt ein ockerfarbener und dicht darüber zwei weitere Flecke von lilablauer (R_f -Wert 0.03) und kirschroter (R_f -Wert 0.05) Farbtonung entstanden. Eine Stunde später hatte sich darüber ein dritter Fleck (R_f -Wert 0.08) von ziegelroter Farbe gebildet, während die vorgenannten drei Flecken stärker geworden waren. Bis zur Beendigung der Photoreaktion war eine stete Zunahme der sekundären Flecken zu beobachten; das Rhein hatte sich schließlich vollständig umgesetzt (siehe Abb. 18).

Rhein ist also offensichtlich als photosensibler Stoff anzusehen. Auch Parietinsäure zeigt in Pyridin ein analoges Verhalten. Das Rhein geht bei der Belichtung in vier papier-

chromatographisch definierbare Stoffe über, wobei auch aus der Verringerung der R_F -Werte auf eine Bildung von Polymerisaten zu schließen wäre. Daß der Einfluß des Lichtes für den Ablauf der Reaktion maßgebend ist, konnten wir daran feststellen, daß sich eine Lösung von Rhein in Pyridin auch bei mehrstündigem Kochen unter absolutem Lichtabschluß nicht veränderte. Das Verhältnis der für das Belichtungsprodukt ermittelten C-Werte (65.00%) zu den H-Werten (3.71%) spricht ebenfalls für eine Polymerisation der Rheinmolekel (ber.: 63.38% C, 282% H).

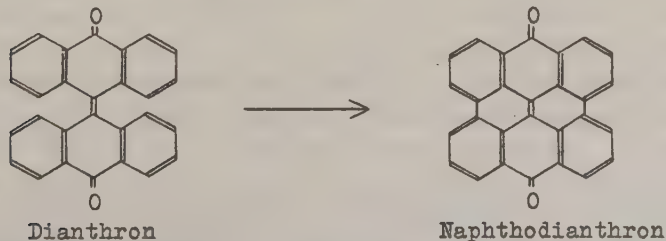
Ein papierchromatographischer Vergleich des Rheinbelichtungsproduktes mit dem bei den vorher beschriebenen Oxydationsversuchen erhaltenen Stoffen und mit einer von I.KÖHLER¹²⁴⁾ bei der Salzsäurehydrolyse der Rhabarberinhaltsstoffe beobachteten Polymerprodukt ergab eine gewisse Analogie in den R_F -Werten und in den Farbtönen.

Es ist somit nicht ausgeschlossen, daß es sich in allen Fällen um gleiche Polymerisationserscheinungen handelt, die durch Oxydationsmittel oder Lichteinfluß oder unter Einwirkung beider Faktoren hervorgerufen werden.

2. Diskussion einer Polymerisationsmöglichkeit

Die Tatsache, daß für die Veränderung des Rheins in Pyridinlösung die Lichteinwirkung entscheidend ist, zeigt eine Analogie zu den von H. BROCKMANN bei der Hypericinsynthese unternommenen Photodehydrierungsversuchen. So gelang es ihm, auf dem Wege oxydativer C-C-Verknüpfung von Phenolen Dianthron in nahezu quantitativer Ausbeute in Naphthodianthron zu überführen¹²⁵⁾.

Formelübersicht IV



124) I.KÖHLER, Dissertation, München 1958

125) H.BROCKMANN u. R.MÜHLMANN, Chem.Ber., 82, 348 (1949)

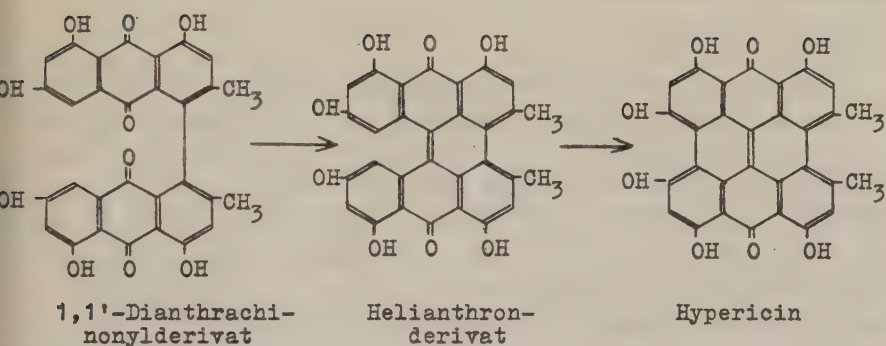
Die Partialsynthese des Hypericins¹²⁶⁾ geht vom Emodin-anthron-(9) aus, bei der sich durch Einwirkung von Licht und Luft in einer Lösung von Pyridin/Piperidin zwei Moleküle Anthron zum Naphthodianthrondervivat (Hypericin) zusammenlagern. Damit war eine photochemische Synthese aus monomeren Anthronderivaten gelungen; die oxydierten Anthraderivate sind jedoch einer direkten Photodehydrierung weniger zugänglich. Daß sich jedoch prinzipiell auch die oxydierten Formen (Anthrachinone) zu entsprechenden polycyclischen Ringsystemen verknüpfen lassen, konnten H. BROCKMANN und F. KLUGE¹²⁷⁾ am 1,1'-Dianthrachinonyl zeigen, die hieraus in geringer Ausbeute Hypericin gewannen (siehe Formelübersicht V).

Die von uns bei den Oxydationsversuchen gemachten Beobachtungen am Sennidin und Rhein lassen es möglich erscheinen, daß hierbei ebenfalls ähnliche polycyclische Systeme entstanden sein könnten*), wobei die Ringverknüpfung auch über die Stufe der Naphthodianthrone weiter fortgeschritten sein könnte. Einen Versuch, Rhein - wie bei Emodinanthron-(9) beschrieben - durch Belichtung in Pyridin/Piperidin in ein entsprechendes Derivat zu überführen und ebenfalls durch chromatographische Adsorption an Gips rein zu gewinnen und dieses mit in gleicher Weise gewonnenen Produkten des Emodinanthron-(9) zu vergleichen, konnten wir aus Substanzmangel nicht weiter verfolgen. Wir beobachteten aber bei der Chromatographie der Lösung an Gips neben einer breiten rasch eluierbaren gelben Zone, die die Hauptmenge des nicht umgesetzten Rheins enthielt, eine schmale violette Zone. Sie ließ sich allerdings mit den üblichen Lösungsmitteln nicht auswaschen, so daß eine Charakterisierung derselben nicht möglich war. Da die beiden Substanzen - Rhein und Emodinanthron-(9) - bei gleicher Behandlung ein analoges Verhalten auf der Säule zeigten, dürfte die Bildung entsprechender Naphthodianthron- oder Helianthrondervivate oder höher kondensierter Systeme aus Rhein wohl in Frage kommen.

126) H. BROCKMANN u. H. EGGERS, Angew. Chem., 67, 706 (1955)

127) H. BROCKMANN u. F. KLUGE, Naturwissenschaften, 38, 141 (1951)
*) nach einer privaten Mitteilung von Professor Dr. H. BROCKMANN, Göttingen

Formelübersicht V



D. Pharmakologische Untersuchungen

I. KÖHLER¹²⁸⁾ hatte bei ihren Untersuchungen über Polymerisationserscheinungen beim Rhein und seinen Derivaten einen Stoff festgestellt, der vornehmlich bei der Oxydation reduzierter Anthrachinone wie des Sennidins und Rheinanthrons, aber auch bei der Hydrolyse der Rhabarberinhaltsstoffe auftritt und dessen Bildung auf Polymerisationserscheinungen beruht: "Aus Rhein entstehen unter oxydativem Einfluß Rheinpolymerprodukte, die je nach den gewählten Versuchsbedingungen in verschiedenen Polymerisationsgraden erhalten werden können. Daß Rhein die Muttersubstanz sämtlicher beschriebenen Polymerisate darstellt, ist erwiesen. Noch zu prüfen ist, ob diese Stoffe pharmakologische Wirkung besitzen."

Schon von verschiedenen Autoren¹²⁹⁾¹³⁰⁾ ist auf die Existenz harzartiger Stoffe in der Droge hingewiesen worden, die eine starke laxierende Wirksamkeit aufwiesen. Um festzustellen, ob es sich bei dem Rheinpolymerprodukt, das bei der Hydrolyse des Rhabarber-

128) I.KÖHLER, Dissertation, München 1958

129) F.TUTIN u. H.W.B.CLEWER, J.chem.Soc.(London), 99, 946 (1911)

130) A.C.BELLAART, Dissertation, Groningen 1952

pulvers beobachtet worden war, um einen ähnlichen Stoff handelte, griffen wir die Anregung I. KÖHLER's auf und untersuchten dessen pharmakologische Wirkung.

1. Wahl einer Methode

Bei der Suche nach einer geeigneten Methode war für uns der Gedanke maßgebend, die Wirksamkeit in Beziehung zu anderen uns zur Verfügung stehenden Anthrachinonen festzustellen, über deren Abführwirkung schon eingehende Untersuchungen vorlagen ¹³¹⁾¹³²⁾. Wir bedienten uns dabei der weißen Maus als Versuchstier, die von H. FÜHNER ¹³³⁾ zum ersten Mal zur pharmakologischen Testung von Abführmitteln verwendet wurde und seither immer wieder zu derartigen Untersuchungen herangezogen wurde. Da es uns darauf ankam, eine einfache im pharmakologischen Laboratorium unseres Institutes durchführbare Methode zu finden, wählten wir das von T.C. LOU ¹³⁴⁾ für eine generelle biologische Wertbestimmung pflanzlicher Abführmittel erarbeitete Verfahren, dessen sich A.C. BELLAART ¹³⁵⁾ und N.M. FERGUSON ¹³²⁾ bei ihren pharmakologischen Versuchen ebenfalls bedient hatten.

2. Diskussion der Ergebnisse

In Übereinstimmung mit den Feststellungen N.M. FERGUSON's ¹³²⁾, R. JARETZKI's ¹³⁶⁾ und H. FÜHNER's ¹³¹⁾ erwiesen sich die untersuchten Anthrachinone Rhein und Chrysophanol als wenig wirksam. (Tabelle 22). Der gleiche laxierende Effekt wie bei diesen wurde schon mit etwa der doppelten Dosis einer guten Rhabarberdroge erreicht. Berücksichtigt man, daß die nicht glykosidisch gebundenen Anthrachinone nur zu etwa 1% in der Droge vorliegen, dann finden wir damit bestätigt, daß diese an der Abführwirkung des Rhabarbers kaum beteiligt sein können. Entsprechend den Untersuchungen H. FÜHNER's ¹³¹⁾ zeigte das

¹³¹⁾ H.FÜHNER u. I.DE DIOS FERNANDEZ, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp.Pathol.Pharmakol., 124, 185 (1927)

¹³²⁾ N.M.FERGUSON, J.Amer.pharmac.Assoc., 45, 650 (1956)

¹³³⁾ H.FÜHNER, Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Pathol.Pharmakol., 105, 249 (1925)

¹³⁴⁾ T.C.LOU, J.Pharmacy Pharmacol., 1, 573 (1949)

¹³⁵⁾ A.C.BELLAART, Dissertation, Groningen 1952

¹³⁶⁾ R.JARETZKI, in R.Wasicky, Leitfaden für die pharmakognostischen Untersuchungen (Leipzig/Wien), 1936, 1.Teil, S. 240

Istizin eine stärkere Wirkung: im Verhältnis der Wirkungs-dosen war Istizin ca. 8mal so wirksam wie die Rhabarberdroge.

Bei der pharmakologischen Prüfung des Polymerproduktes ermittelten wir eine Abführwirkung, die noch erheblich unter der von Rhizoma Rhei lag. Die minimal wirksame Dosis betrug 3 mg per 20 g Maus, während der gleiche Effekt von der Droge mit 0.8 mg per 20 g Maus erreicht werden konnte.

Die Ergebnisse zeigen, daß die untersuchten Polymerprodukte an der Abführwirkung des Rhabarbers nicht beteiligt sein können, denn im Gegensatz dazu wiesen die von F. TUTIN und H.W.B. CLEWER¹³⁷⁾ sowie von A.C. BELLAART¹³⁸⁾ beschriebenen harzartigen Produkte; die bei der Gewinnung der Anthrachinone aus der Droge anfielen, eine den Anthrachinonen überlegene pharmakologische Wirkung auf. Bezogen auf die Gesamtdroge ist nach A.C. BELLAART¹³⁸⁾ für die Erzielung des gleichen laxierenden Effektes 1/6 der Dosis seines harzartigen Stoffes ausreichend, während unser Polymerprodukt erst in der 4fachen Dosis gleiche Wirksamkeit zeigte. Daraus geht hervor, daß die beider Aufbereitung der Anthrachinone aus der Rhabarberdroge beobachteten Polymerprodukte eine Herabsetzung der pharmakologischen Wirkung verursachen. Es kann sich somit nicht um einen Stoff ähnlich dem von F. TUTIN und H.W.B. CLEWER¹³⁷⁾ und A.C. BELLAART¹³⁸⁾ beschriebenen handeln. Es bleibt daher die Frage nach der chemischen Natur dieser stark laxierend wirkenden harzartigen Stoffe weiterhin offen.

¹³⁷⁾ F.TUTIN u. H.W.B.CLEWER, J.chem.Soc.(London), 99, 946 (1911)
¹³⁸⁾ A.C.BELLAART, Dissertation, Groningen 1952

EXPERIMENTELLER TEIL

A. Papierchromatographie

Die papierchromatographischen Untersuchungen wurden auf ungewaschenem Papier Nr. 2043 b Gl der Firma Schleicher u. Schüll, Dassel, aufsteigend und absteigend durchgeführt. Wir benutzten dabei geschliffene Glasglocken bzw. große Glaskammern (20 x 30 x 60 cm) der Firma Bender u. Hobein, München.

Zur Verwendung gelangten folgende Fließmittel:

- | | | |
|--------------------------------------|------------|---------------------|
| a) n-Propanol/Äthylazetat/Wasser | (PÄW) | 4:3:3 (einphasig) |
| b) Petroläther/Toluol/Xylol/Methanol | (PTXM) | 4:1:1:2 (einphasig) |
| c) Äthylazetat/Pyridin/Wasser | (ÄPW) | 7:2:1 (einphasig) |
| d) sek. Butanol/Eisessig/Wasser | (sek. BEW) | 5:3:2 (einphasig) |

Das System (a) diente zur Trennung der Anthrachinonglykoside, im System (b) ließen sich die Anthrachinonaglykone verfolgen. Die Fließmittel (c) und (d) zogen wir zur Identifizierung der Zucker heran. Die Systeme (a) und (b) wurden vornehmlich aufsteigend, (c) und (d) absteigend verwandt.

Die zu chromatographierenden Lösungen wurden punktförmig über einer ca. 75 Watt starken Wärmequelle aufgetragen.

Die Chromatogramme wurden teils unbehandelt unter UV-Licht, teils nach dem Besprühen mit speziellen Reagenzien im Tageslicht oder unter UV-Licht betrachtet. Als Sprühmittel für die Glykoside diente eine 1%ige methanolische Magnesiumazetatlösung, für die Aglykone eine 5%ige methanolische Kalilauge. Zur Charakterisierung der Zucker verwendeten wir eine ammoniakalische Silbernitratlösung oder Anilinphthalatlösung. Nach dem Besprühen mit Magnesiumazetat- bzw. Anilinphthalatlösung wurden die Chromatogramme 15 Minuten bei 105°C im Trockenschrank getrocknet. Die mit Silbernitratlösung besprühten Chromatogramme wurden über strömendem Wasserdampf zur Reaktion gebracht und darauf sofort mit einer 1%igen Natriumthiosulfatlösung fixiert. Die Auswertung der Chromatogramme im UV-Licht erfolgte mit einer UV-Quarzlampe HPW 125 Watt (Maximale Strahlung bei 366 mμ).

B. Isolierung des Glykosids A

1. Herstellung eines Rheum-Gesamtextraktes

Zur Bereitung eines Gesamtextraktes extrahierten wir 500 g einer guten Handelsdroge (Rhiz. Rhei sinensis pulv. der Firma Caesar u. Loretz, Hilden/Rhld.) zweimal mit 1.5 l Methanol im Soxhletapparat bis zur Erschöpfung der Droge. Den Extrakt ließen wir über Nacht im Kolben stehen und filtrierten anschließend von den ausgeschiedenen Gerbstoffen ab. Dann wurde auf dem Wasserbade bis auf etwa 500 ml eingeeengt und bis zur Weiterverarbeitung noch einige Tage stehen gelassen. Jeweils vor der Chromatographie über eine Perlonsäule wurden die Gerbstoffe durch Filtration aus der Extraktlösung entfernt.

2. Chromatographie des Extraktes über Polyamid

Zur Abtrennung der übrigen Anthrachinonglykoside mit Hilfe der Säulenchromatographie verwandten wir eine weitleumige Glassäule (Durchmesser 6 cm), die mit einem Schliffhahn versehen war. Vor der Beschickung mit der Extraktlösung wurde sie in folgender Weise präpariert: Die Säule wurde unten mit einer 1 cm dicken Watteschicht abgedichtet und die Watte gut mit Wasser durchfeuchtet. Etwa 500 g Perlon (Ultramid K 228 BM 2 der Firma BASF, Ludwigshafen, Korngröße 100 - 150 μ) war schon vorher mit Wasser angeschlämmt und die Teilchen, die sich nach mehreren Stunden nicht abgesetzt hatten, abdekantiert worden. Die Aufschwemmung wurde vorsichtig in die Säule gegeben, wobei eine Füllhöhe von 40 bis 50 cm erreicht wurde. Nach dem Absetzen des Perlonpulvers ließen wir das Wasser aus dem Hahn abtropfen, bis der Flüssigkeitsspiegel auf gleicher Höhe mit der Perlonoberfläche war. Hierauf wurde mit einem Stück Filtrierpapier bedeckt, das den Durchmesser der Säule gerade ausfüllte.

100 ml des eingedickten Extraktes wurden mit 35 g Perlon verrieben, so daß dieses eben eine feuchte bröselige Beschaffenheit aufwies. Die Anreibung wurde dann mit einem Löffel vorsichtig auf das Filtrierpapier geschichtet. Die Elution erfolgte mit Wasser bei einer Tropfgeschwindigkeit von 40 bis 50 Tro-

pfen pro Minute. Das Eluat wurde in Fraktionen zu je 100 ml aufgefangen und papierchromatographisch untersucht. Von der zweiten Fraktion an war eine Trennung der Glykoside 1, 2 und 3 neben Verunreinigungen durch Gerbstoff von den übrigen Anthrachinonglykosiden erfolgt. Da die Wanderungsgeschwindigkeit der Glykoside 4 bis 8 mit Wasser sehr gering war, konnten wir die Elution bis zum vollständigen Herauslösen des Glykosids 2 (Glykosid A) durchführen. Das war etwa mit der 15. Fraktion der Fall. Die Fraktionen wurden vereinigt und auf dem Wasserbad unter vermindertem Druck auf ca. 200 ml eingengt.

3. Abtrennung der Gerbstoffe über Ionenaustauscher

Zur Entfernung der Gerbstoffe verwandten wir den stark basischen Ionenaustauscher "Amberlite IRA 400" der Firma Röhm u. Haas, Philadelphia/Pa., der vor der Beschickung mit der Glykosidlösung jeweils aktiviert werden mußte.

Vor Gebrauch ließen wir 150 g des Austauscherharzes über Nacht in Wasser quellen und gaben es in eine Glassäule (Durchmesser 3 cm), deren Boden mit einem Wattebausch bedeckt war. Die Füllung hatte eine Höhe von etwa 30 cm. Wir ließen das überstehende Wasser durch den Hahn abtropfen und gaben sofort 1 n Salzsäure nach, bis die abtropfende Flüssigkeit eine stark saure Reaktion zeigte. Dazu waren etwa 500 ml Säure erforderlich. Das Harz wurde in der Säule mit Wasser bis zur neutralen Reaktion der Waschflüssigkeit gewaschen und dann mit 500 ml 1 n Natronlauge durchspült. Nach dem Auswaschen der Lauge mit Wasser wiederholten wir die Aktivierung mit Salzsäure und Natronlauge, wobei jeweils nach deren Durchlauf mit Wasser bis zum pH 7 ausgewaschen wurde.

200 ml des vorgereinigten Extraktes gaben wir über die aktivierte Säule und ließen mit einer Tropfgeschwindigkeit von 40 Tropfen pro Minute durchlaufen. Dabei wurden die Glykoside an den Ionenaustauscher gebunden; die abtropfende braun gefärbte Flüssigkeit enthielt nur die Gerbstoffe. Vor der Ablösung der Glykoside wuschen wir die Säulenfüllung gut mit 300 ml Wasser, bis das Waschwasser klar ablief. Die Abtrennung der Glykoside vom Austauscherharz erfolgte mit Eisessig bei 30

Tropfen pro Minute. Die zunächst tief orange gefärbte Lösung hellte sich nach einiger Zeit auf, das Eluat färbte sich blaß-gelb. Die Elution wurde an dieser Stelle abgebrochen. Dazu war eine Menge von etwa 800 ml Eisessig erforderlich gewesen. Um eine Spaltung der Glykoside zu verhindern, wurde die Lösung sofort in Anteilen von 200 ml in großen Rundkolben von 2 Litern Inhalt so eingefroren, daß sich das Gefriergut gleichmäßig über die Kolbenwandung verteilte. Bis zur Weiterverarbeitung wurden diese in einer Tiefkühltruhe bei -27°C aufbewahrt. Zur schonenden Destillation des Eisessigs unterwarfen wir die eingefrorenen Lösungen der Gefriertrocknung und lösten den erhaltenen Rückstand in wenig Methanol.

4. Reinigung des Glykosids A über Polyamid

Hierzu verwandten wir eine Glasinternutsche G 3 mit einem Durchmesser von 4.5 cm, die mit einem Schliffhahn versehen war. Eine entsprechende Menge (20 g) mit Methanol angeschlammtes Perlon wurde bis zu einer Füllhöhe von 3.5 cm auf die Säule gegeben. Nach der Entfernung des überstehenden Methanols gaben wir die Lösung der Glykoside vorsichtig auf die Säule und eluierten bei einer Tropfgeschwindigkeit von 30 Tropfen pro Minute mit Methanol. Jeweils nach 30 ml Eluat wurde die Vorlage gewechselt. Von der 5. Fraktion ab war das Glykosid A papierchromatographisch rein enthalten. Die übrigen Fraktionen wurden erneut über Perlon gereinigt. Die reinen Glykosidlösungen wurden vereinigt, auf ein Volumen von 20 ml eingeeengt und unter Zusatz von wenig Wasser zur Kristallisation gebracht. Wir erhielten 80 mg Glykosid A mit einem Zersetzungspunkt von $266 - 270^{\circ}\text{C}$. Das entspricht einer Gesamtausbeute von 0.016%.

C. Identifizierung des Glykosids A

1. Papierchromatographische Untersuchungen

Das Glykosid A verglichen wir mit dem von A.C.BELLAART¹³⁹⁾ freundlicherweise überlassenen Rhein-1-glucosid (Tabelle 8); bei der Untersuchung des Aglykons bezogen wir uns auf ein nach

¹³⁹⁾ A.C.BELLAART u. C.KONINGSBERGER, Recueil Trav.chim.Pays-Bas, 79, 285 (1960)

der Vorschrift von R. ROBINSON und J.L. SIMONSEN¹⁴⁰⁾ hergestelltes Rhein (Tabelle 9). Zur Identifizierung des Glykosidzuckers verglichen wir mit einer aus dem Handel bezogenen Glucose (Tabelle 10).

T a b e l l e 8

Substanz	R _F -Werte	Farbe unbesprüht	
	PÄW	Tageslicht	UV-Licht
Glykosid A	0.41	gelb	orange
Rhein-1-glucosid	0.50	ockergelb	orange

T a b e l l e 9

Substanz	R _F -Werte		Farbe unbesprüht		besprüht mit KOH
	PTXM	PÄW	Tageslicht	UV-Licht	Tageslicht
Aglykon A	0.17	0.64	gelb	gelborange	rotviolett
Rhein	0.17	0.64	gelb	gelborange	rotviolett

T a b e l l e 10

Substanz	R _F -Werte	
	ÄPW	sek. BEW
Glykosidzucker A	0.36	0.42
Glucose	0.35	0.42

2. Schmelzpunkte

Die Schmelz- und Mischschmelzpunkte (soweit authentische Substanzen vorhanden) wurden auf dem Mikroschmelzpunktsapparat nach Kofler bestimmt. Sie sind - bis auf den Schmelzpunkt des Rheins - korrigiert angegeben.

140) R.ROBINSON u. J.L.SIMONSEN, J.chem.Soc. (London), 95, 1085 (1909)

3. Mikroanalysen

Die Elementaranalysen wurden vom Mikroanalytischen Laboratorium A. Bernhardt, Mülheim/Ruhr, durchgeführt. Dazu wurden die Substanzen vorher bei 90°C im Hochvakuum getrocknet. (Zusammenstellung Tabelle 11).

T a b e l l e 11

Substanz	Angabe	C-Werte %	H-Werte %
Glykosid A	gef.	56.23	4.41
Rheinmonoglucosid (446) (C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁)	ber.	56.48	4.04
Aglykon A	gef.	62.34	2.53
Rhein (284) (C ₁₅ H ₈ O ₆)	ber.	63.38	2.82

4. UV-absorptionsspektrophotometrische Untersuchungen

Für die Aufnahme der UV-Absorptionsspektren (Tabelle 12) wurden die Substanzlösungen in geeigneter Konzentration (ungefähr 10⁻⁴ mol = 2 - 5 mg/100 ml) im entsprechenden Lösungsmittel bei einer Schichtdicke von 1 cm (Quarzküvetten) im Zeiss Opton-Spektralphotometer M Q 4 gemessen.

T a b e l l e 12

Substanz	Max _I mμ	Max _{II} mμ	Max _{III} mμ
Glykosid A	226	258	410
Rhein-l-glucosid	227	257	410
Aglykon A	228	257	430
Rhein	229	258	430
Substanzen gemessen in Methanol p.a.			
Glykosid A	252	315	490
Rhein-l-glucosid	255	315	490
Aglykon A	237	380	510
Rhein	235	380	510
Substanzen gemessen in n/100 methanol. Kalilauge			

Die Berechnung des speziellen Extinktionskoeffizienten (Tabelle 13) für Maximum III bei 410 mμ erfolgte nach der Formel:

$$E_{\text{spez.}} = \frac{E_{\text{gem.}}}{c \text{ mal } d}$$

$E_{\text{spez.}}$ = spezieller Extinktionskoeffizient
 $E_{\text{gem.}}$ = gemessene Extinktion bei 410 mμ
 c = Konzentration der Lösung (g/l)
 d = Schichtdicke der Küvetten in cm

T a b e l l e 13

Substanz	Einwaage mg	gelöst in ml	c	d cm	$E_{\text{gem.}}$	$E_{\text{spez.}}$
Glykosid A	1.58	50	0.0316	1	0.39	12.3
Rhein-l-glucosid	1.57	50	0.0314	1	0.53	16.9

5. IR-spektrophotometrische Untersuchungen

Die IR-Spektren wurden im Hochvakuum in den unten angeführten Konzentrationen als KBr-Preßlinge im Perkin-Elmer Infrarotspektrophotometer Nr. 21 des Max-Planck-Instituts für Biochemie, München, gemessen.

Rhein-l-glucosid "BELLAART"	1.03 mg / 300 mg KBr
Glykosid A	0.86 mg / 300 mg KBr
Aglykon A	1.01 mg / 300 mg KBr
Rhein	0.50 mg / 300 mg KBr
"Monorhein"	0.30 mg / 100 mg KBr

6. Hydrolysen

Qualitative Salzsäurehydrolyse

Zur Durchführung einer qualitativen Hydrolyse wurden 10 mg des Glykosids A mit 5 ml 2.5%iger Salzsäure am Rückflußkühler 30 Minuten auf einer Heizplatte gerade eben zum Sieden erhitzt. Nach dem Erkalten wurde die Lösung mit 10 ml Wasser versetzt und für 12 Stunden in einen Eisschrank gestellt. Das ausgefallene Aglykon filtrierten wir über eine Filternutsche G 3

ab, wuschen gut mit destilliertem Wasser nach und reinigten durch Sublimation. Der Schmelzpunkt betrug 310 - 313°C.

Die vom Aglykon befreite saure Zuckerlösung wurde mit wenig Kohle filtriert, mit etwas mehr als der stöchiometrisch berechneten Menge Silberoxyd (250 mg) in Substanz versetzt und gut durchgeschüttelt, bis sich alles Silberoxyd umgesetzt hatte. Die Lösung war jetzt neutral und wurde unter Zusatz einer Spatelspitze Natriumchlorid über Kohle durch ein Hartfilter filtriert. Die so neutralisierte Zuckerlösung wurde zur papierchromatographischen und papierelektrophoretischen Untersuchung verwandt.

Quantitative Hydrolysen

Vor Durchführung der quantitativen Bestimmungen wurde das Glykosid A im Vakuum über Schwefelsäure konstant getrocknet.

Quantitative Auswaage des Aglykons A

Eine gewogene Menge (3.77 mg) des getrockneten Glykosids A wurde mit 5 ml 2.5%iger Salzsäure in einem kleinen Kölbchen am Rückflußkühler auf einer Heizplatte 30 Minuten lang gerade im Sieden erhalten. Wir verdünnten die Hydrolysenlösung mit 10 ml Wasser und stellten sie über Nacht in den Eisschrank. Das vollständig ausgefallene Rheinaglykon wurde dann durch eine konstant getrocknete Mikrofilternutsche G 3 filtriert, mit 20 ml destilliertem Wasser nachgewaschen und im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Wir erhielten 2.12 mg Rheinaglykon, was einem prozentualen Aglykonanteil von 56.2% entspricht. Der theoretisch ermittelte Anteil Aglykon für ein Rheinmonoglucosid beträgt 61.6%.

Spektrophotometrische Bestimmung des Aglykons

Eine genau gewogene Menge Glykosid A wurde mit 5 ml 2.5%iger Salzsäure 30 Minuten am Rückflußkühler auf der Heizplatte hydrolysiert und die Lösung nach dem Abkühlen mit 10 ml destilliertem Wasser verdünnt. In einem kleinen Schütteltrichter wurde das Aglykon quantitativ in 30 ml Äther geschüttelt und der Äther mit Wasser bis zur Neutralität gewaschen. Wir brachten das Aglykon in 2mal 10 ml 5%iger Natronlauge und füllten die Laugenlösung in einem 100 ml Meßkölbchen bis zur Marke mit Methanol auf. Die Lösung wurde unmittelbar nach dem Auffüllen

im Stufenphotometer "Eppendorf" unter Verwendung von monochromatischem Licht (Quecksilberdampfampe, Filter 546 m μ) in Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm gegen eine Vergleichslösung von 20 ml 5%iger Natronlauge und 80 ml Methanol gemessen.

Aus einer für Rhein aufgestellten Eichkurve ermittelten wir den Gehalt (Abb. 19), Ergebnisse siehe Tabelle 14.

T a b e l l e 14

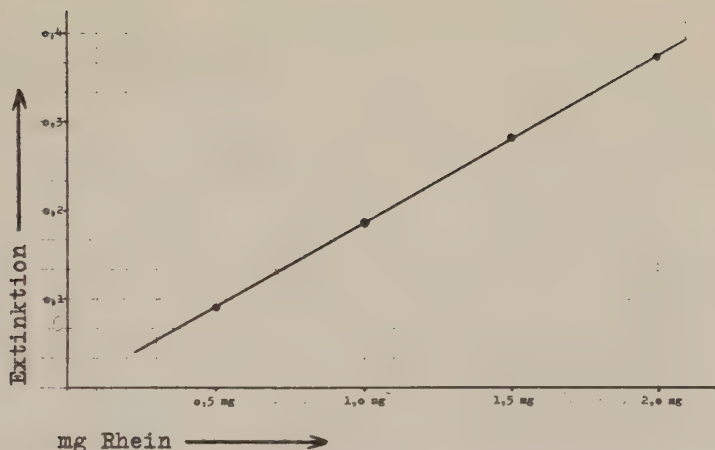
Einwaage mg	Extinktion/ 100 ml	Gehalt lt.Eichkurve		Berechn.Aglykonmenge
		in mg	in %	in %
1.85	0.183	0.979	52.8	61.6
2.00	0.215	1.15	57.5	61.6
2.02	0.204	1.09	54.0	61.6

Die Hydrolyse von Bestimmung 3 war versuchsweise mit 8 n Schwefelsäure über zwei Stunden auf dem Dampfbad durchgeführt worden.

Aufstellung einer Rhein-Eichkurve

5.0 mg Rhein wurden in einem Meßkölbchen in 100 ml Methanol gelöst und von dieser Lösung jeweils 10, 20 und 40 ml in 100 ml Kölbchen pipettiert. Die 4 Lösungen wurden auf 80 ml mit Methanol ergänzt und mit 5%iger Natronlauge bis zur Marke aufgefüllt. Gemessen wurde unmittelbar nach Fertigstellung der Lösung im Stufenphotometer "Eppendorf" unter den gleichen Bedingungen, wie oben angegeben, gegen eine Vergleichslösung von 20 ml 5%iger Natronlauge und 80 ml Methanol. Die Kurve ergab eine Gerade, die durch den Nullpunkt geht und in diesem Bereich dem LAMBERT-BEER'schen Gesetz entspricht. (Abb. 19, Seite 63)

Abb. 19



Eichkurve zur spektrophotometrischen Bestimmung des Rheins gemessen im Stufenphotometer "Eppendorf", (Filter 546 m μ)

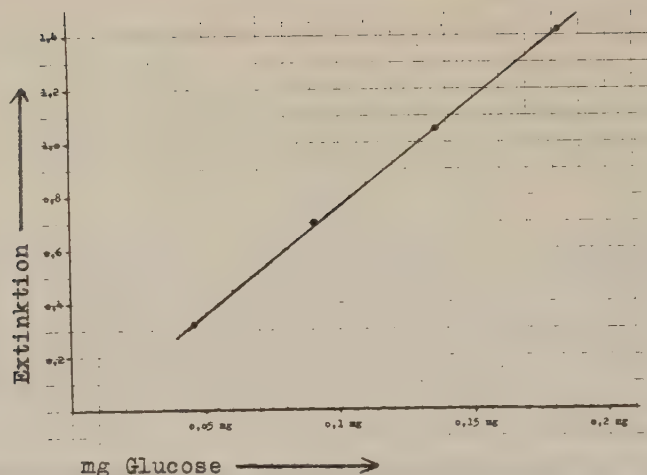
Bestimmung der Zuckerkonzentration

1.10 mg Glykosid A wurden mit 5 ml Eisessig 45 Minuten lang auf einer Heizplatte hydrolysiert und in einem 100 ml Meßkölbchen mit Eisessig bis zur Marke aufgefüllt. Jeweils 1 ml dieser Lösung wurde mit 1 ml Wasser und 4 ml Anthronreagenz (0.2% Anthron in 96%iger Schwefelsäure) versetzt und nach Abkühlen auf Zimmertemperatur gegen eine Vergleichslösung (1 ml Eisessig und 1 ml Wasser und 4 ml Anthronreagenz) im Zeiss Opton-Spektralphotometer M Q 4 bei 620 m μ (Schichtdicke der Küvetten 1 cm) gemessen. Den Gehalt ermittelten wir aus einer für Glucose aufgestellten Eichkurve (siehe Abb. 20 u. Tabelle 15).

T a b e l l e 15

Einwaage mg	Extinktion	Gehalt lt. Eichkurve			Berechn. Aglykon- menge in %
		g/ml	g/10 ml	%	
1.10	0.290	41.2	412	37.5	38.3
1.10	0.285	40.4	404	36.8	38.3

Abb. 20



Eichkurve zur spektrophotometrischen Bestimmung der Glucose (Anthronbestimmung), gemessen im Zeiss Opton-Spektralphotometer M Q 4 bei 620 mμ

Aufstellung einer Glucose-Eichkurve

100.16 mg Glucose ($C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$) = 91.05 mg wasserfreie Glucose lösten wir in einem Meßkölbchen in 100 ml destilliertem Wasser, pipettierten von dieser Lösung jeweils 5, 10, 15 und 20 ml in Meßkölbchen a 100 ml und füllten mit Aqua dest. bis zur Marke auf. In den einzelnen Kölbchen waren also 4.55 mg, 9.10 mg, 13.65 mg und 18.21 mg wasserfreie Glucose in 100 ml Wasser gelöst enthalten. Von diesen Lösungen wurden je 1 ml mit 1 ml Eisessig und 4 ml frisch vorbereitetem Anthronreagenz versetzt und nach dem Erkalten im Zeiss Opton-Spektralphotometer M Q 4 bei 620 mμ gemessen. Als Vergleichslösung verwandten wir eine Mischung von 1 ml Eisessig, 1 ml Wasser und 4 ml Anthronreagenz.

7. Papierelektrophoretischer Nachweis des Zuckers

Die papierelektrophoretischen Untersuchungen wurden in einer Elektrophoresekammer nach W. GRASSMANN und K. HANNIG (Elphor-Gerät der Firma Bender u. Hobein, München) durchgeführt. Die neutralisierte Zuckerlösung trugen wir mit einer dünn ausgezogenen Glaspipette auf 4 cm breite und 31 cm lange Filtrierpapierstreifen Nr. 2043 a Mgl der Firma Schleicher u. Schüll, Dassel, im Abstand von 8.5 cm vom Kathodenende des Streifens auf. Die Papierstreifen wurden von den Enden her bis auf etwa 3 mm an die Auftragstelle mit einer Pufferlösung durchfeuchtet und im angefeuchteten Zustand in die Kammern eingelegt. Dabei hatte sich durch die Saugfähigkeit des Papiers dieses bis an die Auftragstelle durchtränkt.

Als Pufferlösung verwandten wir eine Mischung von 12.4 g Borsäure, 2.92 g Natriumchlorid und 19.1 g Borax in 2 l destilliertem Wasser, die durch 10%ige Natronlauge mit Hilfe eines Potentiometers auf einen pH-Wert von 8.6 gebracht worden war.

Wir entwickelten die Pherogramme während einer Dauer von 12 bis 14 Stunden bei 110 Volt. Nach dem Trocknen wurden sie mit ammoniakalischer Silbernitratlösung besprüht, über Wasserdampf zur Reaktion gebracht und in Natriumthiosulfatlösung fixiert.

Die Zuckerkomponente des Glykosids A hatte wie die Glucose die gleiche Laufrichtung zur Anode und die gleiche Entfernung vom Startpunkt.

Zuckerkomponente Glykosid A	11.4 cm
Glucose	11.3 cm

D. Untersuchungen über die Struktur des Rheins

1. Präparative Darstellungen des Rheins

Rheindarstellung aus Aloin nach R. ROBINSON und J.L.SIMONSEN¹⁴¹⁾

Rheindiazetat:

25 g Aloin B.P. wurden mit 200 ml Essigsäureanhydrid und 25 g wasserfreiem Natriumazetat 45 Minuten lang am Rückflußkühler gekocht. Nach Zersetzung des Essigsäureanhydrids mit Wasser wurde das Azetylaloin gesammelt, 3mal mit 25 ml Wasser gewaschen, im Mörtel zerrieben und an der Luft getrocknet. Das rohe Azetylaloin lösten wir in 200 ml Essigsäureanhydrid und fügten unter guter Kühlung eine Lösung von 25 g Chromsäureanhydrid in 200 ml Eisessig und 15 ml Wasser portionsweise zu. Wir ließen dabei die Temperatur nicht über 50°C ansteigen. Das Gemisch hielten wir unter gelegentlichem Umschütteln während einer Dauer von 2 Stunden bei einer Temperatur zwischen 40° und 50°C und erwärmten anschließend auf dem Wasserbad, bis das Chromsäureanhydrid vollständig umgesetzt war. Die grüne Lösung wurde über Nacht in den Eisschrank gestellt und nach Zusatz der gleichen Menge Wasser wurden die Kristalle auf einer Filternutsche gesammelt. Wir wuschen den gelben Niederschlag gut mit Wasser, bis das Waschwasser gegen Indikatorpapier neutrale Reaktion zeigte und trockneten im Vakuum. Das Rheindiazetat wurde mehrfach aus einem Gemisch gleicher Raumteile Essigsäure und Essigsäureanhydrid und schließlich aus Methanol p.a. umkristallisiert. Wir erhielten 7.5 g Rheindiazetat vom Schmelzpunkt 236 - 238°C entsprechend einer Ausbeute von 30%.

Rhein:

2 g Rheinazetat wurden in 5 ml Methanol suspendiert und mit einer konzentrierten Lösung von 2 g Kaliumhydroxyd in 5 ml Wasser 15 Minuten auf dem Wasserbad erhitzt. Die tiefrotgefärbte Lösung wurde mit 50 ml Wasser verdünnt und mit 20 ml 25%iger Salzsäure versetzt. Um den flockigen Niederschlag kristallin zu erhalten, wurde eine Stunde auf dem Wasserbad erwärmt und durch eine Glasinternutsche G 3 filtriert. Der Niederschlag wurde mit heißem Wasser gewaschen und mehrfach aus Methanol p.a. und

¹⁴¹⁾ R.ROBINSON u. J.L.SIMONSEN, J.chem.Soc. (London), 25, 1085 (1909)

Äther umkristallisiert. Wir erhielten 350 mg Rhein in orange-farbenen nadelförmigen Kristallen vom Schmelzpunkt $310 - 313^{\circ}\text{C}$ (Ausbeute 17.5%).

Rheindarstellung aus Rhizoma Rhei¹⁴²⁾

100 g Rhabarberpulver kochten wir in 1500 ml 70%igem Methanol am Rückflußkühler eine Stunde lang. Nach dem Absetzen des extrahierten Drogenpulvers wurde die überstehende Lösung abgegossen, filtriert und der Rückstand mit 500 ml Methanol nochmals eine Stunde lang gekocht. Die beiden vereinigten Filtrate erhitzen wir nun mit 500 ml konzentrierter Salzsäure 15 Minuten lang auf dem Dampfbad, befreien das Hydrolysat anschließend durch Abdampfen vom Methanol und schüttelten den Rückstand 4mal mit je 600 ml Äther. Die vereinigten Ätherausschüttelungen wurden auf 300 ml eingedampft und bis zur neutralen Reaktion mit Aqua dest. gewaschen und danach 3mal mit je 100 ml 5%iger Natriumbikarbonatlösung geschüttelt. Die anfangs roten und später rotbraun gefärbten Lösungen vereinigten wir und säuerten sie sofort mit 40 ml 25%iger Salzsäure an. Nach dem Absetzen, Zentrifugieren und Filtrieren des Niederschlags durch eine Sinternutsche wurde dieser gründlich mit Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus siedendem Pyridin trockneten wir das nun erhaltene Rhein bei 130 bis 140°C . Wir erhielten 280 mg Rhein vom Schmelzpunkt $310 - 313^{\circ}\text{C}$, was einer Ausbeute von 0.28% entspricht.

2. Herstellung des Diazetylrheinmethylesters

200 mg Diazetylrhein wurden in Methanol p.a. gelöst und mit einer ätherisch-methanolischen Lösung von 60 mg Diazomethan versetzt. Zur Beendigung der Reaktion wurde schwach erwärmt und unter dem Abzug das überschüssige Diazomethan verjagt. Nach mehrtägigem Stehen in der Tiefkühltruhe bei -27°C hatten sich fahlgelbe nadelförmige Kristalle ausgeschieden. Durch mehrmaliges Umkristallisieren aus Methanol p.a. erhielten wir 70 mg Diazetylrheinmethylester vom Schmelzpunkt $181 - 182^{\circ}\text{C}$ (Ausbeute 35%).

3. Molekulargewichtsbestimmung des Diazetylrheinmethylesters

Die Bestimmung des Molekulargewichtes nach K. RAST wurde vom Mikroanalytischen Laboratorium A. Bernhardt, Mülheim/Ruhr, durchgeführt (Tabelle 16). Dazu wurden 20 mg Diazetylrheinmethylester zuvor im Vakuum über Schwefelsäure konstant getrocknet. Das Molekulargewicht errechnet sich nach folgender Formel:

$$M = \frac{e}{L} \cdot \frac{K}{t^0} \cdot 1000$$

M = Molekulargewicht

e = Einwaage der Substanz

L = Einwaage des Lösungsmittels (Campher)

K = Kryoskopische Konstante des Lösungsmittels (Campher)

t⁰ = Temperaturdepression der Lösung

T a b e l l e 16

Einwaage mg	Campher mg	K	t ⁰	Mol.Gew. (C ₂₀ H ₁₄ O ₈)	
				gef.	ber.
1.108	11.433	36.0	9.3	375	382

4. Mikroanalysen

Die Elementaranalysen, Methoxy- und Azetylgruppenbestimmungen (Tabelle 17) wurden vom Mikroanalytischen Laboratorium A. Bernhardt, Mülheim/Ruhr, durchgeführt. Dazu wurden die Substanzen vorher bei 90° im Hochvakuum getrocknet.

T a b e l l e 17

Substanz	C-Werte %	H-Werte %	CH ₃ CO- %	-OCH ₃ %
Rhein (284)	ber. 63.38	2.82	-	-
(C ₁₅ H ₈ O ₆)	gef. 63.06	1.98	-	-
Diazetylrhein	ber. 61.95	3.26	23.35	-
(C ₁₉ H ₁₂ O ₈) (368)	gef. 60.86	3.21	23.66	-
Diazetylrhein- methylester	ber. 62.82	3.66	21.99	8.11
(C ₂₀ H ₁₄ O ₈) (382)	gef. 62.47	3.61	20.28	8.47
Rheinmethylester ("Monorhein")	ber. 64.42	3.35	-	10.02
(C ₁₆ H ₁₀ O ₆) (298)	gef. 62.98	3.65	-	9.26

5. "Spaltungsversuch" am Rhein mit Salzsäure im wässrigen Milieu
entsprechend der Vorschrift von L.HÖRHAMMER, H.WAGNER und
I.KÖHLER¹⁴³⁾

11 mg Rhein lösten wir in einer Mischung von 5 ml n/10 Natronlauge und 5 ml Wasser und versetzten mit 5 ml 25%iger Salzsäure. Wir erhitzen während einer Dauer von 2 Stunden am Rückflußkühler auf dem Wasserbad. Nach dieser Zeit trennten wir die Hälfte der flockig getrübbten Flüssigkeit ab, schüttelten mit 20 ml Äther aus und wuschen mit destilliertem Wasser säurefrei. Die in der Ätherphase befindlichen Stoffe untersuchten wir papierchromatographisch. Den Rest der Reaktionslösung kochten wir erneut 2 Stunden lang am Rückflußkühler auf einer Heizplatte und untersuchten diesen in der gleichen Weise. Es waren papierchromatographisch in keinem Fall andere Stoffe außer Rhein nachzuweisen.

E. Isolierung und Identifizierung des Glykosids B

1. Präparative Papierchromatographie

Bei den Isolierungsversuchen am Glykosid B bedienten wir uns auch der präparativen Papierchromatographie. Durch 10minütiges Schütteln von 1 g Rhabarberpulver mit 10 ml Methanol und anschließender Filtration bereiteten wir ein Mazerat und fertigten hiervon Streifenchromatogramme an. Dazu wurden jeweils 10 ml des filtrierten Extraktes mit einer Blutzuckerpipette auf 4 Papierbogen Nr. 2043 b Gl der Firma Schleicher u. Schüll, Dassel, (Größe 30 x 59 cm) 6 cm vom unteren Rand streifenförmig aufgetragen. Als Laufmittel wählten wir n-Propanol/Äthylazetat/Wasser (4:3:3), die Methode war absteigend. Nach dem Trocknen markierten wir unter UV-Licht die Zone des Glykosids B und schnitten diese aus. Die Streifen wurden zerkleinert und mit 20 ml siedendem Methanol am Rückflußkühler ausgezogen. Glykosid B war nur noch in Spuren vorhanden und hatte sich in Glykosid A umgesetzt.

¹⁴³⁾ L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u. I.KÖHLER, Arch.Pharmaz.Ber.dtsch. pharmaz.Ges., 292/64, 591 (1959)

2. Gewinnung mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie

Zur Bereitung der Kieselgelplatte¹⁴⁴⁾ verwandten wir glattes Spiegelglas (4 mm dick, Größe 12 x 20 cm). Pro Platte wurden 5 g Kieselgel der Firma Merck, Darmstadt, mit 9 ml Wasser schnell angerieben und mittels eines Metallstreichers, der auf einer Glasschiene läuft, schnell auf die Platten aufgetragen und 30 Minuten bei 105°C getrocknet. Die Schichtdicke soll etwa 200 μ betragen.

Die durch 10minütiges Schütteln von 1 g Droge mit 10 ml Methanol bereitete und filtrierte Extraktlösung wurde punktförmig in geringem Abstand voneinander so auf die Platten aufgetragen, daß sich eine ununterbrochene Startlinie bildete. Entwickelt wurde ebenfalls in n-Propanol/Äthylazetat/Wasser (4:3:3). Unter dem UV-Licht wurde nach dem Trocknen der Platte an der Luft mit einem feinen Blattspatel die Glykosid-B-Zone vorsichtig abgekratzt, in einem kleinen Erlenmeyerkolben gesammelt und das Glykosid durch Schütteln mit 10 ml kaltem Methanol herausgelöst. Nach Filtration durch ein Hartfilter hatten wir eine papierchromatographisch reine Lösung von Glykosid B erhalten.

3. Hydrolyse des Glykosids B

5 ml der durch präparative Plattenchromatographie erhaltenen Lösung wurden bei 35°C unter vermindertem Druck bis auf 1 ml eingengt und mit 2 ml 2.5%iger Salzsäure am Rückflußkühler 30 Minuten lang zum Sieden erhitzt. Nach dem Erkalten wurde die Lösung mit 10 ml Wasser verdünnt und das Aglykon mit 20 ml Äther ausgeschüttelt. Die mit 30 ml Wasser gewaschene Ätherphase wurde direkt zur papierchromatographischen Untersuchung verwandt.

Die von der Ätherphase abgetrennte saure Zuckerlösung wurde zur Entfernung des restlichen Äthers kurz erhitzt und mit wenig Kohle filtriert. Zur Neutralisation wurde die Lösung mit wenig mehr als der stöchiometrisch berechneten Menge Silberoxyd (etwa 100 mg) versetzt und gut geschüttelt, bis sich alles Silberoxyd umgesetzt hatte. Dann wurde unter Zusatz einer Spa-

144) E.STAHL, Chemiker-Ztg., 82, 323 (1958)

telspitze Natriumchlorid und Kohle durch ein Hartfilter filtriert und die neutrale Zuckerlösung zur papierchromatographischen Untersuchung verwandt.

4. Papierchromatographische Untersuchungen

Zur Identifizierung des Aglykons bezogen wir uns auf ein nach der Vorschrift von R. ROBINSON und J.L. SIMONSEN¹⁴⁵⁾ hergestelltes Rhein; den nach der Hydrolyse erhaltenen Zuckerteil verglichen wir in verschiedenen Systemen mit einer Glucose der Firma C. Schuchardt, München. (Zusammenstellung siehe Tabelle 18 - 20).

T a b e l l e 18

Substanz	R_F -Werte PÄW	Farbe unbesprüht	
		Tageslicht	UV-Licht
Glykosid A	0.41	gelb	orange
Glykosid B	0.21	ockergelb	orange

T a b e l l e 19

Substanz	R_F -Werte		Farbe unbesprüht		besprüht mit KOH
	PTXM	PÄW	Tageslicht	UV-Licht	Tageslicht
Aglykon B	0.17	0.64	gelb	gelborange	rotviolett
Rhein	0.17	0.64	gelb	gelborange	rotviolett

T a b e l l e 20

Substanz	R_F -Werte in	
	ÄPW	sek. BEW
Glykosidzucker B	0.35	0.43
Glucose	0.35	0.42

145) R.ROBINSON u. J.L.SIMONSEN, J.chem.Soc. (London), 95, 1085 (1909)

5. UV-spektrophotometrische Untersuchung des Glykosids B

Für die Aufnahme der UV-Absorptionsspektren (siehe Tabelle 21) wurden 2 ml der methanolischen Lösung des Glykosids B soweit verdünnt, bis sie eine geeignete Konzentration für eine dem Glykosid A bzw. dem Rhein-l-glucosid A.C. BELLAART's¹⁴⁶⁾ vergleichbare Kurve aufwies. Die Messungen wurden im Zeiss Opton-Spektralphotometer M Q 4 in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm durchgeführt.

T a b e l l e 21

Substanz	Max _I mμ	Max _{II} mμ	Max _{III} mμ
Glykosid B	-	265	410
Glykosid A	226	258	410
Rhein-l-glucosid	227	257	410
Substanzen gemessen in Methanol p.a.			

F. Über Polymerprodukte des Rheins

1. Untersuchung der Oxydationsprodukte des Sennidins

Hierzu wurden Hydrolysen auf zwei verschiedenen Wegen durchgeführt:

- 5 mg Sennosid B wurden mit 8 ml 25%iger Salzsäure 15 Minuten am Rückflußkühler auf einer Heizplatte hydrolysiert und nach Zusatz von 30 ml Äther 10 Minuten auf dem Dampfbad erwärmt. Im Schütteltrichter wurde vom Äther abgetrennt und die wässrige Phase noch einmal mit 20 ml Äther ausgeschüttelt. Die vereinigten Ätherphasen wurden mit destilliertem Wasser neutral gewaschen und mit Äther auf 50 ml gebracht (Lösung I).
- 5 mg Sennosid B hydrolysierten wir mit einer Mischung von 1 ml 25%iger Salzsäure und 7.5 ml Eisessig in der gleichen Weise wie oben, versetzten die klare Hydrolysenlösung mit

¹⁴⁶⁾ A.C.BELLAART u. C.KONINGSBERGER, Recueil Trav.chim.Pays-Bas, 79, 285 (1960)

30 ml Äther und erhitzen 10 Minuten auf dem Dampfbad. Nach dem Auswaschen des Eisessigs mit Wasser wurde mit Äther auf 50 ml aufgefüllt (Lösung II).

Die Lösungen I und II wurden bei den Oxydationsversuchen in gleicher Weise behandelt. Von den Lösungen wurden je 3mal 10 ml mit 10 ml n/1 Natronlauge ausgeschüttelt und verschiedenen Oxydationen unterworfen:

- a) Zusatz von 0.2 ml H_2O_2 (3%) und 4 Minuten auf dem Wasserbad erhitzen,
- b) Zusatz von 0.2 ml H_2O_2 (3%) und 15 Minuten auf dem Wasserbad erhitzen,
- c) Zusatz von 3 ml einer 30%igen Eisenchloridlösung und 1 Stunde auf dem Wasserbad erhitzen.

Unmittelbar nach Beendigung der Reaktion wurden die Lösungen in 20 ml Äther geschüttelt und mit Wasser gewaschen. Chromatographiert wurden die ätherischen Ausschüttelungen der verschiedenen Oxydationsmethoden (a), (b) und (c) der Lösungen I und II.

2. Belichtung von Rhein in Pyridin

Etwa 5 mg Rhein wurden in einem kleinen Erlenmeyerkolben in 20 ml Pyridin gelöst und für die Dauer von 26 Stunden unter Lichteinwirkung gehalten. Als Lichtquellen dienten uns Tageslicht und als Kunstlichtquelle zwei 20 Watt starke Neonlampen. Nach 30 Minuten, 2 1/2, 7, 22 und 24 Stunden wurde die Lösung im Zeiss Opton-Spektralphotometer M Q 4 in Quarzküvetten (Schichtdicke 1 cm) gemessen. Zur Erlangung einer geeigneten Konzentration wurde die Lösung jeweils vor der Messung entsprechend mit Pyridin verdünnt. Chromatographiert wurde die pyridinige Lösung nach 1, 2, 5 1/2, 8 1/2, 21, 23 und 26 Stunden.

3. Erhitzen von Rhein in Pyridin unter Lichtabschluß

Wir wogen 3 mg Rhein auf ein Kartenblatt und pipettierten 20 ml Pyridin in einen kleinen Rundkolben mit Schliffhals. Erst unter Lichtabschluß lösten wir das Rhein im Pyridin und erhitzen am Rückflußkühler über eine Dauer von 5 Stunden zum Sieden. Als Heizquelle diente uns ein Heizpilz. Der Versuch wurde in einer Dunkelkammer durchgeführt. Eine Verfärbung der Lö-

sung war während dieser Zeit nicht zu beobachten gewesen.

4. Belichtungsversuch mit Rhein in Pyridin/Piperidin entsprechend einer Vorschrift von H. BROCKMANN und H. EGGERS¹⁴⁷⁾

25 mg Rhein wurden in einer Mischung von 2 ml Pyridin und 0.2 ml Piperidin gelöst und während einer Stunde bei 100°C ein kontinuierlicher Luftstrom durchgeleitet. Die Reaktionslösung wurde mit 50 ml einer 12.5%igen Salzsäure gut durchgeschüttelt und der Niederschlag abzentrifugiert. Nach einmaligem Waschen mit 10 ml kaltem Wasser trockneten wir bei 105°C und lösten das Produkt in 10 ml Dioxan. Bei der Chromatographie der Dioxanlösung über eine Säule (Durchmesser 1 cm, Füllhöhe 10 cm) mit aktiviertem Gips (Handelsgips 2 - 3 Stunden bei 160°C erhitzt) konnten wir zwei Zonen feststellen. Die erste, breite Zone war gelborange gefärbt und enthielt nach der papierchromatographischen Untersuchung ausschließlich Rhein. Sie ließ sich rasch mit Dioxan aus der Säule auswaschen. Im oberen Teil der Säule hatte sich eine zweite, schmale Zone von violetter Farbe ausgebildet, die mit Dioxan nur sehr geringe Wanderungsgeschwindigkeit zeigte. Auch mit anderen wasserfreien Lösungsmitteln wie Cyclohexan, Azeton, Methanol war eine Elution nicht zu erreichen.

G. Pharmakologische Untersuchungen

Beschreibung der Untersuchungsmethodik

Zur Verwendung gelangten männliche weiße Mäuse im Gewicht zwischen 15 und 25 g. Für die Zeit, in der die Mäuse nicht im Versuch waren oder für diesen vorbereitet wurden, waren sie in gut durchlüfteten Metallkäfigen untergebracht. Ihre Standardkost war Hafer, sie wurden aber jeweils drei Tage vor dem Versuch nur mit Weißbrot gefüttert. Nach dem Versuch erhielten sie zunächst wieder Hafer. Es wurde sorgfältig darauf geachtet, daß die Zeit zwischen zwei Versuchen wenigstens eine Woche betrug, um eine zu starke Beanspruchung des Organismus und Gewöhnung zu vermeiden.

147) H. BROCKMANN u. H. EGGERS, Angew. Chem., 67, 706 (1955)

Am Versuchstag wurden die Mäuse gewogen und für die Dauer des ganzen Versuches einzeln in geräumigen Gläsern gehalten, deren Bodenfläche mit Filtrierpapier bedeckt war. Nach der Abtrennung der Tiere voneinander beobachteten wir bis zum Versuchsbeginn die Art der Ausscheidungen. Mäuse, die während der Zeit der Vorbeobachtung (3 Stunden) breiigen oder flüssigen Kot aufwiesen, wurden für diese Versuchsreihe nicht verwandt. Am Versuchstage wurde den Mäusen kein neues Futter gegeben, so daß die Tiere vom frühen Morgen an bis zur Beendigung des Versuches nüchtern blieben.

Die zu untersuchenden Substanzen wurden mit einer 20%igen Tweenlösung zu einer dünnflüssigen Suspension angerieben, wobei die zugeführte Menge auf das Gramm Maus bezogen war. Die Konzentration der Lösung war also so berechnet, daß für eine 20 g schwere Maus die erforderliche Anzahl mg Substanz pro g Maus gerade in 0.5 ml der Suspension enthalten war. Damit erreichten wir, daß alle Tiere einer Versuchsreihe die gleiche Lösung und in Bezug auf ihr Gewicht die gleiche Menge Flüssigkeit zugeführt bekamen. Die dem Gewicht der Mäuse entsprechende Anzahl Milliliter wurde den Tieren mit einer Schlundsonde direkt in den Magen eingegeben. Dazu diente eine vorn abgestumpfte Kanüle von 8 cm Länge und der größten Breite von 2 mm, an die eine Recordspritze im Fassungsvermögen von 1 ml mit einer 1/100 ml-Einteilung angeschlossen war.

Für den Vergleich der pharmakologischen Wirksamkeit des Polymerproduktes mit den in ihrer Wirkung bekannten Laxantien (Rhein, Chrysophanol, Istizin, Rhizoma Rhei) war es erforderlich, zunächst den Wirkungsgrad dieser bekannten Anthrachinone für unsere Versuchsbedingungen festzustellen. Ausgehend von einer gut wirksamen mg-Dosis pro g Maus wurde diese ständig soweit erniedrigt, bis die Grenze der feststellbaren physiologischen Wirksamkeit eben erreicht war. Registriert wurden die Anzahl der positiv reagierenden Mäuse sowie die Anzahl der breiigen oder flüssigen Ausscheidungen. In der Tabelle 22 sind die Ergebnisse unserer Untersuchungen zusammengefaßt, wobei wir entsprechend dem Schema A.C. BELLAART's¹⁴⁸⁾ die mittlere Anzahl positiver Ausscheidungen pro Maus als vergleichbaren Wert für die Wirksamkeit ansehen.

148) A.C.BELLAART, Dissertation, Groningen 1952

T a b e l l e 22

Substanz	Dosis mg per 20 g Maus	Anzahl Mäuse im Versuch	Anzahl Mäuse positiv	Anzahl posit. Ausscheidg.	Mittl. Anzahl Aus- scheidg. pro Maus
Rhizoma Rhei	4.0	10	7	27	2.7
	2.0	10	8	19	1.9
	1.0	10	2	6	0.8
	0.8	10	1	1	0.1
Istizinin	1.0	10	10	42	4.2
	0.2	8	2	10	1.25
	0.1	10	2	2	0.2
Rhein	1.0	10	9	23	2.3
	0.6	10	5	9	0.9
	0.4	10	2	2	0.2
Chrysophanol	1.0	15	12	29	2.4
	0.8	9	4	12	1.35
	0.6	10	4	8	0.8
	0.4	9	3	3	0.33
	0.3	10	1	1	0.1
Polymerprodukt	20.0	18	15	44	2.5
	10.0	14	11	27	1.9
	5.0	10	6	11	1.1
	3.0	8	1	1	0.1

L e b e n s l a u f

Am 27. Juli 1932 wurde ich, Klaus Meyer, als Sohn des Apothekers Hermann Meyer und Frau Grete, geb. Bieker, in Hamm in Westfalen geboren.

Ostern 1938 begann in der Volksschule in Bochum (Westfalen) meine Schulzeit. Im Herbst 1942 kam ich in die Oberschule für Jungen in Lüdinghausen (Westfalen), an der ich am 5. März 1952 meine Reifeprüfung ablegte.

Nach zweijähriger Praktikantenausbildung in der "Alten-Markt-Apotheke" in Lingen/Ems bestand ich am 22. März 1954 in Osnabrück das pharmazeutische Vorexamen.

Dem Pharmazie-Studium oblag ich an der Philipps-Universität in Marburg an der Lahn, das ich mit dem Staatsexamen am 28. März 1957 beendete.

Nach einjähriger praktischer Tätigkeit in der Apotheke meines Vaters, der Bahnhof-Apotheke, Oelde (Westfalen), erhielt ich zum 1. April 1958 die Bestallung als Apotheker.

Im Mai 1958 begann ich am Institut für pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München unter Leitung des Institutsdirektors, Herrn Professor Dr. L. Hörhammer, die Ausarbeitung der vorliegenden Dissertation.

